

Zur Charakterisierung eines
niedermolekularen Proteaseninhibitors
aus menschlichem Bronchialsekret

Thomas Naumann

*Diss
München
1984*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenkranke
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. H.-H. Naumann

Zur Charakterisierung eines niedermolekularen Proteaseninhibitors
aus menschlichem Bronchialsekret

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig - Maximilians - Universität
zu München

vorgelegt von
Thomas Naumann
aus
München
1984

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:.....Prof.Dr.K.Hochstrasser.....

Mitberichterstatter:.....Prof.Dr.H.Fritz.....

Dekan:.....Prof.Dr.W.Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....8.Mai 1984.....

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	1
2.	Theoretischer Teil	2
2.1	Vorkommen und Funktion von Proteasen	2
2.2	Einige wichtige Proteasen	2
2.3	Proteaseninhibitoren	4
2.3.1	Aufbau und Funktion von Proteaseninhibitoren	5
2.4	Seruminhibitoren	7
2.4.1	Alpha 1 - Antitrypsin	7
2.4.2	Alpha 2 - Macroglobulin	7
2.4.3	C1 - Inaktivator	8
2.4.4	Antithrombin III	9
2.4.5	Antichymotrypsin	9
2.4.6	Inter - Alpha - Trypsininhibitor	9
2.5	Proteaseninhibitoren im Respirationstrakt	10
2.5.1	Bedeutung des Alpha 1 - Antitrypsin	10
2.5.2	Niedermolekulare Bronchialsekretinhibitoren (BSI)	11
3.	Spezieller Teil	12
3.1	Untersuchungsmaterial	12
3.2	Gelchromatographie	13
3.3	Säurefällung und Anreicherung	13
3.4	Versuch d. Reindarstellung mittels Affinitäts- chromatographie	14
3.5	Versuch der immunologischen Charakterisierung	16
3.6	Rechromatographie	17
3.7	Bestimmung des Molekulargewichts von BSI-TE*	18
3.8	Hemmwirkung von BSI-TE* auf Granulozytenelastase	18
4.	Diskussion	19
5.	Experimenteller Teil	23
5.1	Inhibitornachweis im optischen Test	23

5.2	Gelchromatographie	24
5.3	Säurefällung	25
5.4	Affinitätschromatographie	25
5.5	Immundiffusionstechnik nach Ouchterlony	27
5.6	Immunelektrophorese	27
6.	Zusammenfassung der Ergebnisse	29

ZUR CHARAKTERISIERUNG EINES NIEDERMOLEKULAREN PROTEASENINHIBITORS AUS MENSCHLICHEM BRONCHIALSEKRET

1. Einführung

Der menschliche Organismus verfügt bekanntlich über ein effizient funktionierendes System zur Abwehr exogener Noxen, das in hohem Maße zu seiner Behauptungsfähigkeit in der Umwelt beiträgt. Zu diesem System gehören eine ganze Reihe ihrer Funktion nach grundverschiedene Faktoren: Auf mechanischer Ebene stellen Haut, Schleimhaut mit den Flimmerepithelien u. a. eine wirksame Barriere dar; Makrophagen und T-Lymphozyten verkörpern die Abwehr auf zellulärem Niveau. In diese Funktionsgemeinschaft gliedern sich des weiteren Immunglobuline ein, die primär im Serum antigenes Material bekämpfen, von hier aus aber auch in andere Körperflüssigkeiten übertreten.

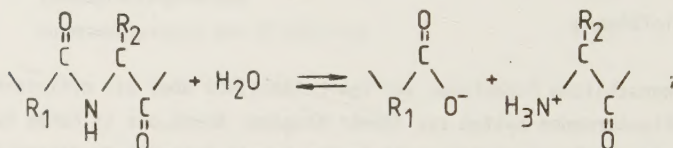
Erst vor relativ kurzer Zeit wurde die Wissenschaft auf die biologische Bedeutung einer Gruppe von Stoffen im Organismus aufmerksam, die eine hemmende Wirkung auf proteolytische Enzyme ausüben und sich unter diesem Aspekt sinnvoll in das Abwehrsystem einfügen. Für einige dieser sogenannten Inhibitoren konnte bisher zweifelsfrei ein Zusammenhang mit dem Auftreten bestimmter Erkrankungen gesichert werden. Zahlreiche Forschungsgruppen arbeiten in jüngerer Zeit auf dem Gebiet der Inhibitoren; die Ergebnisse rechtfertigen in hohem Maße die Annahme, daß Inhibitoren bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen aggressiven und protektiven Faktoren eine wichtige Rolle zufällt.

Der Respirationstrakt ist aufgrund seiner Funktion des ständigen Stoffaustauschs mit der Umwelt Angriffsort zahlreicher schädigender Einflüsse, denen u. a. auch bronchialspezifische Inhibitoren entgegenwirken.

2. Theoretischer Teil

2.1 Vorkommen und Funktion von Proteasen

Enzyme, die in der Lage sind, Peptidbindungen zu spalten, werden als Proteasen bezeichnet. Die Spaltung erfolgt hydrolytisch nach dem Schema



das Reaktionsgleichgewicht liegt weit auf der Seite der Spaltung (28). Im Organismus sind Proteasen an einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen beteiligt wie z.B. der Aufspaltung der Nahrungsproteine, der Aktivierung von Proenzymen sowie der Phagozytose als proteolytisch aktiver Inhalt der Lysosomen von Makrophagen. Neben den Amylasen stellen sie wohl die wichtigsten hydrolytischen Enzyme dar.

Nach dem Ort des proteolytischen Angriffs an der Polypeptidkette werden Endo- und Exopeptidasen unterschieden. Letztere spalten jeweils vom Carboxyl- oder Aminoende her Aminosäuren ab; Endopeptidasen dagegen spalten die Polypeptidkette in ihrem Verlauf, wobei die Spaltstellen bevorzugt bei bestimmten, von Protease zu Protease unterschiedlichen Aminosäureresten liegen. Proteasen zeigen also keine Substratspezifität im Sinne einer ausschließlichen Wirkung auf ein oder mehrere Zielproteine, sondern eher eine Strukturspezifität auf definierte Merkmale eines sonst nahezu beliebig aufgebauten Proteins.

Wie bei allen Enzymen geht auch bei den Proteasen die katalytische Wirkung nicht vom Molekül als Ganzem aus, sondern vom sogenannten "Aktiven Zentrum", einer im Rahmen der charakteristischen, räumlichen Faltung der Polypeptidkette zur Quartärstruktur entstandenen Aggregation bestimmter Kettenanteile. Die Fähigkeit zur Proteolyse geht folglich bei Denaturierung, d.h. Zerstörung der Quartärstruktur durch Säureeinwirkung, organische Lösungsmittel u.a. irreversibel verloren, obwohl die Aminosäuresequenz intakt ist.

2.2 Einige wichtige Proteasen

Pepsin ist eine Endoprotease, die als inaktives Pepsinogen von den

Hauptzellen der Magenmukosa gebildet und im sauren Milieu des Magensaftes aktiviert wird. Auch eine Autoaktivierung durch Pepsin selbst ist nachgewiesen; es findet dabei die Abspaltung eines definierten Peptids vom Proenzym statt. Nahrungsproteine werden von Pepsin zu Peptiden von 300 bis 6000 Da aufgespalten. Das pH-Optimum des Pepsins liegt zwischen pH 1,3 und 3; es spaltet bevorzugt nach Tyrosin- und Phenylalaninresten (29).

Trypsin: Vom exokrinen Anteil des Pankreas wird Trypsin als inaktive Vorstufe (Zymogen) ins Duodenum sezerniert und hier seinerseits durch limitierte Proteolyse über Enteropeptidase und Trypsin aktiviert. Das Molekül besteht aus 223 Aminosäuren, deren Sequenz komplett aufgeklärt ist, und spaltet bevorzugt nach Lysin- und Argininresten. Sein pH-Optimum liegt bei pH 7 bis 9, sein Molekulargewicht beträgt ca. 24.000 Da (29).

Chymotrypsin: Es wird wie Trypsin vom Pankreas gebildet und ins Duodenum sezerniert. Hier erfolgt die Aktivierung durch eine Konformationsänderung des Moleküls, die über Trypsin induziert wird. Chymotrypsin besteht aus 246 Aminosäuren bekannter Sequenz, hat ein Molekulargewicht von 25.000 Da und spaltet jeweils nach Tyrosin-, Tryptophan-, Leucin- und Phenylalaninresten.

Erfolgt die Aktivierung der beiden letztgenannten Proteasen verfrüht, wie z.B. im Rahmen einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis, und daher noch im Organ statt im Duodenum, so hat das in der Regel die Selbstverdauung des Organs zur Folge (46).

Proteasen bei der Blutgerinnung: Die kaskadenartig ablaufende Aktivierung der einzelnen Gerinnungsfaktor-Vorstufen geschieht auf dem Wege der limitierten Proteolyse. Ein aktivierter Gerinnungsfaktor entwickelt z.T. unter Beteiligung von Cofaktoren wie Ca^{2+} , Phospholipiden aus Thrombozyten u.a. proteolytische Aktivität gegenüber dem ihm in der Reihenfolge nachgeordneten Faktor, ein Vorgang, der auf jeder einzelnen Stufe diversen Kontrollmechanismen unterworfen und so subtil steuerbar ist (30). Am Ende der Kaskade spaltet die Protease Thrombin vom Fibrinmolekül zwei Seitenketten ab und es entsteht das polymerisationsfähige Fibrinmonomer. Thrombin stabilisiert zudem zusammen mit Faktor XIII das Gerinnsel.

Bei der Fibrinolyse wird unter Einwirkung verschiedener Aktivatoren aus Gewebe und Serum die Protease Plasmin aktiviert, die hohe Affinität zu Fibrinpolymerisaten hat und diese zu löslichen Peptiden spaltet. Die Spaltprodukte hemmen ihrerseits die Thrombinwirkung und den Polymerisationsvorgang. Dem Plasmin wird zudem eine Rolle bei der Freisetzung von Entzündungsmediatoren zugesprochen (36).

Renin-Angiotensin-System: Renin, eine Protease aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere, spaltet vom Alpha 2-Globulin Angiotensinogen das Angiotensin I ab, welches durch Abspaltung weiterer 2 Aminosäuren zum Angiotensin II wird. Dieses Peptid ist stark vasoaktiv wirksam und regt die Aldosteronproduktion der Nebenniere an (37).

Kathepsine: Als Kathepsine werden eine Reihe intrazellulär lokalisierter Proteasen mit verschiedensten Eigenschaften zusammengefaßt. Sie liegen in Lysosomen gebunden vor, haben ein schwach saures pH-Optimum und sind an Phagozytose und Zellautoolyse beteiligt (38).

Granulozytäre Proteasen: Durch einen besonders reichhaltigen Proteasenbestand zeichnen sich polymorphkernige (PMN-) Leukozyten aus. Elastase und Kollagenase sind darunter wohl die wichtigsten Vertreter. Diese Enzyme ermöglichen dem Granulozyten das Vordringen im Gewebe und somit das Erreichen von Entzündungsherden durch Auflösung des bindegewebigen Fasergerüsts (50).

Bakterielle Proteasen: Eine Reihe von Bakterien wie z.B. Streptomyces griseus, Bac. subtilis und Clostridien sind zur Bildung von Proteasen befähigt, die sie in die Lage versetzen, Wirtsgewebe zu verdauen und sich so ungehindert auszubreiten. Bakterielle Proteasen sind z.B. Thermolysin und auch Kollagenase (39).

2.3 Proteaseninhibitoren

Zum Schutz vor dem Angriff proteolytischer Enzyme verfügt der Organismus über eine Reihe von Substanzen, die ihrer Funktion nach "Anti-Enzyme" sind und daher die Bezeichnung Inhibitoren tragen. Ihre Existenz postulierte erstmals WEINLAND im Jahre 1903 nach der Beobachtung der

Resistenz von Nematoden im Verdauungstrakt gegenüber den Verdauungsenzymen (57).Damit etwa parallel wurden Beobachtungen über die hemmende Wirkung des Serums auf verschiedene Enzyme veröffentlicht,ohne jedoch die dafür verantwortlichen Komponenten näher zu definieren. 1936 gelang KUNITZ und NORTHRUP die Reindarstellung des polyvalenten Inhibitors Aprotinin (33).Seither wurde in verschiedenen Bereichen des Körpers eine Vielzahl von Inhibitoren gefunden,denen in Bau und Funktion wesentliche Gemeinsamkeiten zugrunde liegen.

2.3.1 Aufbau und Funktion von Proteaseninhibitoren

Inhibitoren sind ihrer chemischen Natur nach häufig Glykoproteine.Der Kohlehydratanteil scheint dabei weniger für die inhibitorische Aktivität als vielmehr für die Zellwandpermeation von Bedeutung zu sein (15). Wie ihre Antagonisten - die Proteasen - verfügen Inhibitoren über funktionsspezifische Bereiche in der Polypeptidkette ("reactive sites"), die mit der "active site" der zu hemmenden Protease nach dem Prinzip Schlüssel-Schlüsselloch korrespondieren.

Heute werden aufgrund strukturanalytischer Untersuchungen drei Typen von Inhibitoren unterschieden:

a) Inhibitoren mit nur einer "reactive site",die jeweils nur ein Molekül einer definierten Reihe von Proteasen zu blockieren vermögen.

Abb.1 zeigt den schematisierten Aufbau eines Inhibitors dieses Typs am Beispiel des polyvalenten Trypsininhibitors aus Rindergewebe BPTI (= Aprotinin).Die Aminosäure im reaktiven Zentrum ist hier Lysin.

b) Inhibitoren, die aus zwei oder mehr kovalent verbundenen Inhibitoruntereinheiten aufgebaut sind, somit zwei (oder mehr) unterschiedlich gebaute "reactive sites" haben und deshalb gleichzeitig mit verschiedenen Proteasen reagieren können.Zu diesem Typ wird der Inhibitor HI-30 aus menschlichem Serum gerechnet, dessen Struktur Abb.2 zeigt.HI-30 ist ein doppelköpfiger Inhibitor mit einem antitryptischen und einem antielastolytischen Hemmzentrum.Für die antitryptische Aktivität scheint das Vorhandensein der Aminosäuren Arginin oder Lysin im reaktiven Zentrum von Bedeutung zu sein (siehe auch BPTI),während ein Methioninrest an entsprechender Stelle wahrscheinlich die Hemmwirkung gegen Elastase determiniert.Die spezifischen Untereinheiten solcher zusammengesetzter Inhibitoren werden als

"domains" bezeichnet.

c) Inhibitoren, die zwar polyvalent sind, sich aber nicht in domains zergliedern lassen. Sie sind nicht zu gleichzeitiger Hemmung mehrerer Proteasen fähig, was mit enger räumlicher Nähe der "reactive sites" erklärt wird, die bei Interaktion des einen Hemmzentrums mit einer Protease zur sterischen Blockierung des anderen führt (21); (Abb.3). Ein solcher Aufbau wird für das Alpha 1-Antitrypsin des menschlichen Serums und auch für die hier untersuchten Bronchialsekret-Inhibitoren angenommen.

Bei der Hemmreaktion bildet das Proteasemolekül mit dem Inhibitor einen Komplex, der dem physiologischen Enzym-Substratkomplex entspricht.



(E)= Enzym ; (I)= Inhibitor; (EI)= Enzym-Inhibitorkomplex; (P)=Reaktionsprodukt; k1 - k4=Reaktionskonstanten

Das Reaktionsgleichgewicht ist dabei abhängig vom pH der Lösung und der Konzentration der Komponenten. Bereits auf der Stufe der Komplexbildung kann Hemmung der Protease erreicht sein: Der Enzym-Inhibitor-Komplex bleibt bestehen, ohne daß es zur Spaltung oder sonstigen Veränderung des Inhibitormoleküls kommt. Jedoch ist auch ein Fortschreiten der Reaktion zur echten Proteolyse möglich; der Zerfall in Enzym und Produkt unterbleibt aber. Damit ist das aktive Zentrum der Protease für weitere Reaktionen blockiert.

Die Hemmung kann reversibel, irreversibel und temporär sein. Der Begriff "temporär" bezeichnet einen Hemmtyp, bei dem der Inhibitor im Komplex derart alteriert wird, daß er für weitere Proteasemoleküle in seiner Substanz angreifbar wird. Dies zieht den Verlust der Hemmwirkung nach sich (34).

Bezüglich ihrer Reaktionsspezifität verhalten sich die bekannten Inhibitoren unterschiedlich. Es sind streng monovalente Inhibitoren bekannt wie z.B. das Antichymotrypsin, aber auch polyvalente, die in der Lage sind, mehrere Proteasen zu hemmen (z.B. Aprotinin).

2.4 Seruminhibitoren

Das menschliche Serum gehört zu den hinsichtlich ihrer inhibitorischen Potenz bestuntersuchten Körperkompartements. Eine Reihe von Inhibitoren, die nur oder hauptsächlich hier vorkommen, sind beschrieben. Im Folgenden seien die wichtigsten genannt.

2.4.1 Alpha 1 - Antitrypsin

Beim Alpha 1- Antitrypsin (al-PI) handelt es sich um ein Glykoprotein mit dem Molekulargewicht 58.000 Da. Bei der Serumelektrophorese ist es in der Alpha 1 - Fraktion zu finden; sein Kohlehydratanteil beträgt ca. 16 %. Es existieren mehrere genetische Varianten des al-PI, deren häufigster Phänotyp die Bezeichnung MM trägt. Der seltenste Phänotyp ZZ geht mit einer al-PI Serumkonzentration von nur 10 % des MM-Typs einher. Bei Trägern des ZZ-Typs konnte ein signifikant gehäuftes Auftreten von schweren Lungenemphysemen, juveniler Leberzirrhose und Atemnotsyndromen nachgewiesen werden (32). al-PI hemmt Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Elastase sowie leukozytäre und akrosomale Proteasen (49). Seine Serumkonzentration beträgt physiologisch 200 - 400 mg%. Es ist für ca. 70% der gesamtinhibitorischen Kapazität des Serums verantwortlich, wurde aber auch in Sekreten nachgewiesen (Respirationstrakt). Im Bronchialsekret liegt es relativ konzentriert im Bereich der unteren Atemwege vor. Im pH-Bereich von 6,0 bis 9,8 ist al-PI stabil. Bei pH 4,0 wird der Inhibitor praktisch sofort inaktiviert; er ist also nicht säurestabil (31). TRAVIS vermutet die Hauptfunktion des al-PI in der Neutralisierung von Proteasen im Extrazellulärraum und im anschließenden Transport der Komplexe in den Vaskulärraum, wo ein Transfer der Proteasen auf andere Seruminhibitoren stattfinden soll (52).

2.4.2 Alpha 2 - Macroglobulin

Das Alpha 2 - Macroglobulin hat ein Molekulargewicht von 726.000 Da und läuft bei der Serumelektrophorese in der Alpha 2 Fraktion. Nach ROBERTS et.al. besteht das Molekül aus 8 Untereinheiten von je ca. 80.000 Da. Alpha 2 - Macroglobulin (a2-MG) liegt normalerweise in einer Serumkonzentration von 150 - 400 mg% vor (44).

Sein Hemmspektrum erstreckt sich auf alle Endopeptidasen, einige bak-

terielle Proteasen wie Kollagenase von *Clostridium histolyticum* und Proteasen von *Staphylococcus aureus* und *Proteus* (3). Bei pH-Wechsel und unter Einwirkung von Substanzen, die SH-Bindungen reduzieren, dissoziiert das Molekül in seine Untereinheiten (45).

a₂-MG zeigt einen Hemmechanismus, der sich von dem anderer Inhibitoren grundlegend unterscheidet. Es konnte gezeigt werden, daß gebundene Proteasen ihre Aktivität nicht wie sonst üblich verlieren, sondern weiter Substrat spalten können. Ihre Aktivität bleibt im komplexierten Zustand allerdings an eine geringe Molekülgröße ihrer Substratproteine gebunden. BARRETT et.al. entwickelten daraus die sogenannte "trap hypothesis" zum Reaktionsmodus des a₂-MG. Derzufolge induziert eine angreifende Protease am Inhibitormolekül eine Konformationsänderung. Im derart veränderten Zustand des Inhibitors ist die Protease quasi gefangen. Für hochmolekulare Substrate sind die eingeschlossenen Proteasen nicht mehr zugänglich. Eine Spaltung ist nicht möglich und echte Hemmung wird erreicht. Dieser Hemmtyp ist irreversibel (4). TRAVIS vermutet im a₂-MG den Seruminhibitor, der am Proteasentransfer von a₁-PI als Akzeptor beteiligt ist, indem es durch a₁-PI aus dem Extrazellulärraum geholt Proteasen im Vaskulärraum "übernimmt", mit ihnen neue Komplexe formiert, die dann in der Leber metabolisiert werden (52). GANROT et.al. zeigten ferner, daß bei Kindern weit höhere Serumspiegel zu finden sind als bei Erwachsenen, bei denen wiederum die Serumspiegel von Frauen ca. 20% höher liegen als die der Männer. Nach HORNE haben Östrogene einen stimulierenden Einfluß auf die Höhe des a₂-MG Spiegels (12). In der Synovia von Patienten mit Arthritis der Kniegelenke soll nach FEINSTEIN et.al. a₂-MG gehäuft in inaktivem Zustand vorliegen (8).

2.4.3 C1-Inaktivator

Der C1-Inaktivator (C1-INA) hemmt die Faktoren C1r und C1s des Komplementsystems, die Gerinnungsfaktoren XII (Hageman-Faktor), XIa, ILa und Plasmakallikrein. Seine Serumkonzentration liegt zwischen 15 und 35 mg%. Klinische Relevanz erlangte der C1-INA, als DONALDSON einen Zusammenhang zwischen erniedrigten Inhibitorspiegeln im Serum und dem Auftreten des hereditären, angioneurotischen Ödems (HANE) entdeckte, einer intermittierenden, umschriebenen Anschwellung von Haut und Schleimhäuten (7).

2.4.4 Antithrombin III

Antithrombin III (AT III) ist ein Glykoprotein vom Molekulargewicht 65.000 Da mit einem Kohlehydratanteil von ca. 15%. Es ist inhibitorisch wirksam gegen die Gerinnungsfaktoren II und X (Stuart-Faktor). Es wurde ein Zusammenhang zwischen erniedrigten AT III Serumspiegeln und erhöhten Faktor X Konzentrationen beobachtet. Dies führte ZUCK et.al. zu der Annahme eines dauernden Verbrauchs von AT III durch Faktor X (59). Bei hereditärem Mangel von AT III stellten V.D.MEER et.al. eine gesteigerte Thromboserate fest (53).

2.4.5 Antichymotrypsin

Dieser Inhibitor hemmt ausschließlich Chymotrypsin; nach bisher unveröffentlichten Ergebnissen von HOCHSTRASSER wird er allerdings in neuerer Zeit als Antagonist chymotrypsinähnlicher Proteasen (Chymase) aus Mastzellen und Lysosomen betrachtet. Sein Molekulargewicht beträgt 68.000 Da bei einem Kohlehydratanteil von 29%; seine Serumkonzentration liegt bei 30-60 mg% (14).

2.4.6 Inter-Alpha-Trypsininhibitor

Der Inter-Alpha-Trypsininhibitor ITI ist ein Seruminhibitor vom Molekulargewicht 180.000 Da, der im Serum in einer Konzentration von 20-70 mg% vorliegt. Er bildet bei der elektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine eine Bande zwischen der Alpha 1- und -2 Fraktion. Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin werden durch ITI gehemmt, nicht aber leucozytäre Proteasen.

Das ITI-Molekül zeichnet sich in vitro und in vivo durch große Instabilität aus. Bei der Elektrophorese von mehrere Tage alten ITI-Präparationen läßt sich bereits keine einheitliche Bandendarstellung wie zu Beginn mehr erzielen (51). HOCHSTRASSER gelang der Nachweis, daß ITI in vivo zu inhibitorisch aktiven Fragmenten zerfällt.

Dieser Zerfall beruht auf limitierter Proteolyse. In vitro konnte dieser Zerfall durch Inkubation des ITI mit Trypsin erreicht werden. Die entstehenden Polypeptide haben ein Molekulargewicht von 30.000 Da, zeigen ein mit dem ITI identisches Hemmspektrum und immunologische Kreuzreaktion mit diesem. In vivo werden diese Fragmente (im Folgenden als HI-30 bezeichnet) renal eliminiert. Sie transsudieren in geringen

Mengen in Bronchial- und Nasensekret. Im sauren Milieu ist HI-30 im Gegensatz zu ITI stabil. Durch Trypsininkubation von HI-30 gelingt ein weiterer Abbau zu Peptiden vom Molekulargewicht 14.000 Da, die ebenfalls die unveränderte inhibitorische Potenz des ITI wie auch die immunologische Kreuzreaktion mit diesem aufweisen. Diese Fragmente (HI-14) werden in vivo nicht beobachtet. Wie HI-30 sind sie säurestabil. Durch prolongierte Trypsininkubation gelingt der weitere Abbau zu Fragmenten vom Molekulargewicht 8.000 Da, bei denen sich immunologisch keine Kreuzreaktion mit ITI mehr, wohl aber dessen unveränderte Hemmfunktion nachweisen läßt. Diese Fragmente werden als HI-8 bezeichnet und stellen die eigentliche funktionelle Grundeinheit des ITI dar. So ergibt die Aminosäureanalyse wie auch die Sequenzierung für HI-14 den Aufbau aus zwei HI-8 Einheiten. HI-30 präsentiert sich als Produkt zweier Tandemdomains HI-14 und eines N-terminalen Peptids aus 21 Aminosäuren. Beide Domains sind zueinander und zu bekannten Inhibitoren vom Kunitz-Typ homolog. Wie auch HI-14 konnte HI-8 in vivo nicht nachgewiesen werden. Wie schon erwähnt geht der HI-30, der in hohem Maße gewebebegängig ist, mit einiger Wahrscheinlichkeit aus dem ITI hervor, der somit als intravasale Transport- und Depotform des HI-30 angesehen werden kann (26).

2.5 Proteaseninhibitoren im Respirationstrakt

Seit der Beobachtung einer erhöhten Frequenz obstruktiver Atemwegserkrankungen bei Trägern eines bestimmten Genotyps mit daraus resultierendem α_1 -PI Mangel durch LAURELL und ERICKSSON im Jahre 1963 ist die Untersuchung der Wechselwirkung von Proteasen und Inhibitoren im Respirationstrakt Gegenstand der Arbeit vieler Forschungsgruppen geworden. Nach neueren Erkenntnissen wird der Schutz der Mucosa gegen Proteasen vorwiegend leucozytären Ursprungs dabei durch den Synergismus mehrerer Inhibitoren gewährleistet (35).

2.5.1 Bedeutung des Alpha 1-Antitrypsin

α_1 -PI ist aufgrund seines Hemmspektrums in der Lage, einen wirksamen Schutz der Gewebe im Respirationstrakt vor dem proteolytischen Angriff der vorwiegend leucozytären Proteasen zu bieten. Beim Zerfall

von Leukozyten, die bei bronchopulmonalen Infektionen massiv ins Entzündungsgebiet eindringen, werden diese Proteasen freigesetzt. Die Einwirkung leukozytärer Elastase bewirkt dabei den Schwund der Alveolarsepten durch Zerstörung des Elastinfasergerüsts des Lungenparenchyms. Experimentell ließen sich auf diese Weise bei Versuchstieren Emphyseme erzeugen, deren Atemluft pflanzliche Proteasen beigemischt worden waren, die nicht durch al-PI hemmbar waren.

Das aus dem Serum ins Bronchialsekret transsudierende al-PI wirkt hauptsächlich in den unteren Abschnitten des Bronchialsystems. Es ist nach Untersuchungen von HOCHSTRASSER et al. hier aber nur für ca. 10-20% der inhibitorischen Gesamtkapazität des Bronchialsekrets verantwortlich (19). In vitro gelang der Nachweis, daß al-PI nach Oxidation eines Methioninrests im aktiven Zentrum selektiv seine Hemmwirkung gegen Granulozyten- und Pankreaselastase verliert, seine antitryptische Aktivität jedoch in vollem Umfang erhalten bleibt (27). Eine wichtigere Rolle als dem al-PI im antiproteolytischen Schutzsystem des Respirationstrakts kann aber heute einer Gruppe niedermolekularer Inhibitoren zugesprochen werden, die vor allem durch HOCHSTRASSER und Mitarbeiter näher charakterisiert werden konnten.

2.5.2 Niedermolekulare Bronchialsekretinhibitoren (BSI)

Im Gegensatz zu al-PI stammen die BSI-Inhibitoren nicht aus dem Serum. Sie werden im Bronchialsystem von Drüsen in der Submucosa gebildet und sezerniert. Im sauren Milieu sind sie stabil, weswegen sie experimentell leicht vom säurelabilen al-PI abzutrennen sind. HOCHSTRASSER's Arbeiten belegen, daß BSI-Inhibitoren den antiproteolytischen Schutz des oberen Respirationstrakts zu 80-90% übernehmen. Zwei Inhibitoren dieser Gruppe waren bisher charakterisiert:

a) BSI-TE: Er ist der Inhibitor mit dem breiteren Hemmspektrum. Er hemmt Trypsin, Chymotrypsin, Kathepsin G und Elastase aus PMN-Granulozyten. Gegen Pankreaselastase zeigt er keine Wirkung. Sein Molekulargewicht beträgt 11.000 Da. Er ist nahe verwandt oder gar identisch mit dem Human-Seminalplasma-Inhibitor HUSI (9).

b) BSI-E: Dieser Inhibitor zeigt Hemmung gegen Pankreas- und Granulozytenelastase, wirkt jedoch nicht gegen Trypsin und Chymotrypsin.

Er unterscheidet sich im Molekulargewicht nicht von BSI-TE und wird durch Inkubation mit Trypsin irreversibel zerstört.

Der Aminosäureaufbau beider Inhibitoren ist sehr ähnlich; beide zeigen einen hohen Prolinanteil. Signifikante Unterschiede ergeben sich nur im Gehalt an Glutaminsäure, Methionin und Lysin. Als N-terminale Aminosäure wurde für BSI-TE und BSI-E übereinstimmend Tyrosin gefunden. BSI-TE zeigt eine immunologische Kreuzreaktion mit monovalenten, gegen HUSI gerichteten Antikörpern vom Kaninchen, BSI-E hingegen nicht (10,47,16). Eine zusammenfassende Übersicht der im Bronchialsekret auftretenden Inhibitoren gibt die Tabelle 1.

Die niedermolekularen Inhibitoren liegen im Bronchialsekret physiologischerweise in freier Form vor, d.h. nicht im Komplex mit Proteasen. Tatsächlich ist aber ein mehr oder weniger großer Anteil der Inhibitoren dennoch ständig komplexiert und entzieht sich somit dem einfachen Nachweis, da dieser Anteil inhibitorisch "stumm" ist. Bei BSI-E beträgt die Menge komplexierten Inhibitors annähernd 100%, bei BSI-TE variiert sie interindividuell recht stark (42). Im Verlauf der Untersuchung dieses Phänomens des unterschiedlichen Komplexierungsverhältnisses der BSI-Inhibitoren im Bronchialsekret ergaben sich Hinweise auf die Existenz eines dritten Inhibitors dieses Typs mit Hemmwirkung gegen Trypsin, Granulozytenelastase und Pankreaselastase. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, diesen Inhibitor zu isolieren und näher zu charakterisieren.

3. Spezieller Teil

3.1 Untersuchungsmaterial

Den Anforderungen der Fragestellung hätte sicher nur reines Bronchialsekret als Untersuchungsmaterial in optimaler Weise entsprochen. Da es jedoch unmöglich war, reines Bronchialsekret in den für die Untersuchungen erforderlichen, großen Mengen zu erhalten, wurde zur Inhibitorisolierung gepooltes Sammel Sputum eines Patientenkollektivs mit verschiedenen bronchopulmonalen Erkrankungen verwendet. Es lag zunächst in lyophilisierter Form vor und wurde vor Beginn der Versuche in Lösung gebracht. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurde die Lösung zentrifugiert und zur Darstellung der Einzelkomponenten der Gelchro-

matographie zugeführt.

3.2 Gelchromatographie

Bei der Gelchromatographie handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung einer Lösung verschiedener Substanzen in ihre Einzelkomponenten nach deren Molekülgröße, wobei große Moleküle die Chromatographiesäule schneller durchlaufen als kleine Moleküle.

Das gelöste Sputumlyophilisat wurde auf die Säule aufgebracht und der Proteingehalt des Eluats durch Messung der Extinktionsänderung bei 280 nm kontinuierlich bestimmt. Das Eluat wurde fortlaufend in 10 ml Fraktionen gesammelt. Das Elutionsdiagramm der Sputumchromatographie ist in Abb. 4 wieder gegeben. Man erkennt darauf vier Proteinpeaks. Die Screeningtestung der Fraktionen auf inhibitorische Aktivität gegen Trypsin und Pankreaselastase als spezifische Parameter für BSI-TE bzw. -E ergab solche Aktivität in einem für beide Inhibitoren übereinstimmenden Bereich, der etwa dem Peak 2 der Abbildung entspricht. Antitryptische Aktivität war wesentlich stärker meßbar als antielastolytische Aktivität, was in Einklang mit der Erfahrung stand, daß BSI-E nativ fast völlig komplexiert vorliegt.

3.3 Säurefällung und Anreicherung

Es war zu erwarten, daß im Eluat größere Inhibitormengen in komplexierter und daher inaktiver Form vorlagen, die der Messung inhibitorischer Aktivität zunächst entgangen waren. Den Fraktionen vor dem Peak 2 (Inhibitor in unkomplexierter Form) wurde daher je eine Probe entnommen und der Säurefällung unterzogen. Auf diese Weise denaturieren säurelabile Komplexproteasen und der freigesetzte, säurestabile Inhibitor wird nachweisbar. Bei diesem Verfahren denaturiert zudem Alpha 1-Antitrypsin und geht daher in die folgenden Bestimmungen der Hemmkapazität als störender Faktor nicht mehr ein. Der säurestabile HI-30 dagegen bleibt erhalten. Er wurde im Anschluß an die Säurefällungen in einem neuerlichen Gelchromatographielauf entfernt, bei dem er seines höheren Molekulargewichts wegen eine größere Laufgeschwindigkeit als die Bronchialsekretinhibitoren hatte.

Die im nativen Zustand des Eluats in Peak 2 gefundene Aktivität war erwartungsgemäß auch nach der Säurefällung in vollem Umfang zu messen.

Die Testung der Fraktionen des Peak 1 ergab einen starken Anstieg antitryptischer und antielastolytischer Aktivität in diesem Bereich (Abb.5).

Im Anschluß wurden die inhibitorhaltigen Fraktionen der Peak 1 (freigesetzter Inhibitor) und 2 (nativ freier Inhibitor) jeweils untereinander vereinigt und zur Anreicherung der Aktivität durch Eindampfen im Vakuum konzentriert. Ein negativer Einfluß des Konzentrierungsverfahrens (Erwärmung) auf die Stabilität des Inhibitors konnte nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde eine Hälfte der Inhibitorlösung aus Peak 1 abgeteilt und unter Vorstellung einer gewissen Schutzfunktion des Komplexes im rohen Zustand eingedampft und erst dann gefällt, während die andere Hälfte der Inhibitorlösung aus Peak 1 zunächst gefällt und anschließend eingedampft wurde. Für die folgenden Untersuchungen standen also drei verschiedene Inhibitor-Rohpräparationen zur Verfügung:

- A: Material mit antitryptischer und antielastolytischer Aktivität, im nativen Sputum unkomplexiert.
- B: Material mit Hemmwirkung gegen Trypsin und Pankreaselastase, nativ komplexiert und nach Anreicherung aus Komplex freigesetzt.
- C: Material mit Hemmwirkung gegen Trypsin und Pankreaselastase, nativ komplexiert und vor Anreicherung aus dem Komplex freigesetzt.

Um mehr Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben, wurde das oben beschriebene Isolierungsverfahren mehrmals in gleicher Weise wiederholt. Alle Präparationen zeigten die gleichen Extinktionskurvenverläufe (siehe Abb.4); die Aktivitätsverteilungen im Eluat waren reproduzierbar. Unter der Annahme übereinstimmender Zusammensetzung wurden die korrespondierenden Fraktionen mit den Lösungen A - C vereinigt.

3.4 Versuch der Reindarstellung mittels Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie stellt ein hochselektives Trennverfahren dar, dem als Funktionsprinzip die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes zugrunde liegt. Der Komplexpartner der zu isolierenden Komponente wird an einen Träger gekoppelt, ohne jedoch dabei inaktiviert zu werden (= immobilisiertes Enzym). Passiert nun ein Substanzgemisch mit dem erwarteten Stoff die Säule, so wird durch Ausbildung

eines Enzym-Substratkomplexes die zu isolierende Substanz zurückgehalten, während alle anderen Stoffe ausgewaschen werden. Nach hinreichender Spülung kann beispielsweise mittels eines pH-Wechsels in der Spüllösung die Komplexbindung gelöst und die gesuchte Substanz ausgewaschen werden.

Im vorliegenden Fall wurden Trypsin und Pankreaselastase als jeweils selektive Zielproteasen für BSI-TE und BSI-E an Sepharose gekoppelt. Aus den Lösungen A-C sollten auf diese Weise die Bronchialsekretinhibitoren rein dargestellt werden können.

Durch Arbeiten von HOCHSTRASSER war bekannt, daß BSI-E bei Inkubation mit Trypsin weitgehend zerstört wird (17). Es war daher erforderlich, zur Isolierung von BSI-E jeweils die Hälfte der Inhibitorlösungen A-C abzutheilen und unter Vermeidung der Passage über Trypsinsepharose getrennt an Pankreaselastase-Sepharose zu verarbeiten.

Nach Passage der Pankreaselastase-Sepharose zeigten alle drei Inhibitorlösungen A-C hohe Verluste in Höhe von ca. 95% der zuvor aufgegebenen antielastolytischen Aktivität. Die antitryptische Aktivität konnte dagegen bei Passage der Inhibitorpräparationen über Trypsinsepharose fast ohne Verluste in 1-2 Fraktionen konzentriert gewonnen werden (Abb.6).

Völlig unerwartet gelang der Nachweis erheblicher Mengen antielastolytischer Aktivität in den über Trypsinsepharose angereicherten Inhibitorlösungen B und C. Dies war mit HOCHSTRASSER's Beobachtung der irreversiblen Inaktivierung von BSI-E bereits nach kurzzeitiger Inkubation mit Trypsin nicht zu vereinbaren und deutete auf die Existenz eines weiteren, bisher unbekannten Inhibitors mit Hemmwirkung gegen Pankreaselastase und Trypsin hin.

Zur Objektivierung dieses Phänomens wurde eine exakte Hemmkinetik der Inhibitorlösungen A-C gegen Pankreaselastase bestimmt (Abb.7). Der Hemmkurvenverlauf zeigt deutlich, daß die Hemmwirkung der Inhibitorlösung A gegen Pankreaselastase gegenüber derjenigen von B und C vernachlässigbar gering war und möglicherweise nur auf einem unspezifischen Effekt beruhte. In der Hemmkinetik, in der zur besseren Vergleichbarkeit die eingesetzten Inhibitormengen nach mU Trypsinhemmung standardisiert waren, zeigte die Lösung B deutlich die stärkste Hemmaktivität gegen Pankreaselastase.

Das Vorliegen von antitryptischer zusammen mit antielastolytischer Aktivität war hier aus zwei Gründen nur durch die Existenz eines neuen Inhibitors zu erklären:

- BSI-TE, dessen alleiniges Vorkommen in den inhibitorhaltigen Fraktionen nach Trypsinsepharose-Passage erwartet worden war, hemmt Pankreaselastase nicht.
- BSI-E wird bei der Passage von Trypsinsepharose inaktiviert. Selbst im (empirisch ausgeschlossenen) Fall einer ausbleibenden Inaktivierung wäre er keinesfalls am Harz gebunden worden, da er mit Trypsin nicht reagiert, und hätte dann aktiv im Durchlauf nachweisbar sein müssen. Diesbezügliche Kontrollen verliefen jedoch negativ.

3.5 Versuch der immunologischen Charakterisierung

Die Untersuchung der Verwandtschaft oder gar Identität des neuen Inhibitors mit bekannten Inhibitoren war nachfolgend von großem Interesse. Ähnlichkeiten mit BSI-TE und -E hinsichtlich Molekulargewicht (annähernd gleiche Laufgeschwindigkeit bei der Gelchromatographie), Hemmspektrum und Ort des Vorkommens im Körper legten die Vermutung biochemischer Verwandtschaft nahe.

Mangels geeigneter Antikörperlösungen gegen BSI-E war eine diesbezügliche Untersuchung nicht möglich. Gegen BSI-TE gerichtete Antikörper standen hingegen in Form von Anti-HUSI Antiserum vom Kaninchen zur Verfügung (siehe S.11).

Zunächst wurden die Inhibitorlösungen A - C mittels der Immundiffusionstechnik nach Ouchterlony untersucht: Nach mU Trypsinhemmung standardisierte Inhibitormengen diffundierten - nach Konzentrationen gestuft - in Agarose-Trärgel gegen Anti-HUSI Antiserum. Abb.8 zeigt, daß alle drei Inhibitorlösungen von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentrationsstufe mit dem Antiserum identische Präzipitationsmuster ausbildeten, was die Annahme einer Verwandtschaft des neuen Inhibitors (im Folgenden als BSI-TE* bezeichnet) mit BSI-TE erhärtete.

Anschließend wurde das immunologische Verhalten der Inhibitorlösung A und B, die sich hinsichtlich der Hemmaktivität gegen Pankreaselastase am deutlichsten unterschieden, im wesentlichen spezifischeren Verfahren der Immunelektrophorese weiter untersucht (Abb.9).

Das völlig identische Präzipitationsmuster von A und B konnte ange-

sichts der doch erheblichen Unterschiede im Hemmspektrum nicht mehr im Sinne immunologischer Identität interpretiert werden. Vielmehr war als Erklärung für diese Diskrepanz eine quasi überlagernde Verunreinigung der Inhibitorlösungen B und C mit BSI-TE anzunehmen. Daraus ergab sich die Notwendigkeit weiterer Reinigungsschritte der Präparationen.

3.6 Rechromatographie

Da der Inhibitor aus Lösung A nur sehr geringe Hemmaktivität gegen Pankreaselastase gezeigt hatte, wurde für Lösung A das alleinige Vorkommen von BSI-TE angenommen. In die weitere Untersuchung von BSI-TE* ging Lösung A daher nicht mehr ein. Unter der aus Hemmkinetik und -spektrum abgeleiteten Vermutung lediglich gradueller, nicht aber struktureller Heterogenität wurden die Inhibitorlösungen B und C zum Gesamtinhibitorpool vereinigt.

Es war nun geplant, BSI-TE* im gepoolten Inhibitorgemisch mit Pankreaselastase zu komplexieren. Der so gebildete Komplex sollte vom nicht komplexierten BSI-TE bei erneuter Gelchromatographie durch ein erheblich höheres Molekulargewicht und damit größere Laufgeschwindigkeit deutlich abgrenzbar sein.

Der Inhibitorpool wurde mit Pankreaselastase bis zum fast völligen Verschwinden freier antielastolytischer Aktivität austitriert. Ein restloses Verschwinden freier inhibitorischer Aktivität und damit völlige Komplexierung wurde nicht erreicht; ein Teil des gebildeten Komplexes lag offensichtlich stets dissoziiert vor.

Bei der im Anschluß durchgeführten Gelchromatographie erwies sich der in vitro gebildete Komplex als instabil. Freie Pankreaselastase eluierte als größtes Molekül zuerst und konnte anhand der Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit in den betreffenden Fraktionen über die Umsatzgeschwindigkeit des Leerwerts hinaus identifiziert werden. In einem Abstand dahinter, d.h. im Bereich deutlich kleinerer Molekulargewichte, folgten einige Fraktionen mit antitryptischer und antielastolytischer Aktivität, die unscharf in eine Zone rein antitryptischer Aktivität übergang (Abb. 10). Aufgrund dieser Hemmeigenschaft wurde der erste Aktivitätspeak als BSI-TE*, der zweite Aktivitätspeak als BSI-TE angesprochen.

Da angesichts des geringen Abstandes der inhibitorhaltigen Fraktionen eine ausreichende Trennung der Inhibitoren noch nicht gewährleistet schien, wurden die Fraktionen vor und nach einer angenommenen, durch die ungefähre Mitte beider Peaks gelegten Grenzlinie vereinigt, mittels Druckdialyse konzentriert und ein weiteres Mal chromatographiert.

Die Screeningtestung der auf diese Weise erhaltenen Fraktionen ergab das erwartete Resultat: Den BSI-TE*-haltigen Fraktionen folgten unmittelbar Fraktionen mit geringer BSI-TE-Aktivität, die mit Sicherheitsabstand abgeteilt und verworfen wurden.

Die BSI-TE*-Fraktionen wiesen nach Vereinigung und erneuter Konzentrierung die anfangs aufgegebene Aktivität fast ohne Verlust auf.

3.7 Bestimmung des Molekulargewichts von BSI-TE*

Die für die Gelchromatographie verwendete Sepharosesäule war vor ihrer erstmaligen Benutzung mit vier Proteinen definierten Molekulargewichts geeicht worden. Dabei waren die Parameter Molekulargewicht und Elutionsvolumen der Proteine Trasylol (6.000 Da), Cytochrom C (13.000 Da) und Hämoglobin (64.000 Da) in eine grob lineare Beziehung gesetzt worden. Das Molekulargewicht von Dextranblau liegt weit oberhalb des vom Hersteller angegebenen Auftrennspektrums des Sepharosegels und passierte daher die Säule mit maximaler Geschwindigkeit (Ausschlußgrenze).

Anhand der so gewonnenen Eichgerade konnte das Molekulargewicht von BSI-TE* als ungefähr 13.000 Da bestimmt werden, also geringfügig größer als das von BSI-TE und -E (11.000 Da); (Abb.11).

3.8 Hemmwirkung von BSI-TE* auf Granulozytenelastase

Von besonderem Interesse war das Hemmverhalten von BSI-TE* gegenüber Granulozytenelastase, einer -wie schon erwähnt- für entzündungsbedingte Parenchymschäden im Respirationstrakt mitverantwortlichen Protease. Im Gegensatz zu Trypsin und Pankreaselastase, die im Respirationstrakt physiologischerweise nicht vorkommen und für die Untersuchungen nur als geeignete "Indikatoren" benutzt wurden, stellt Granulozytenelastase also in vivo einen Antagonisten von BSI-TE* dar. Es wurde eine Hemmkinetik erstellt; die eingesetzten Inhibitormengen wurden nach

mU Trypsinhemmung standardisiert.

Abb. 12 zeigt, daß BSI-TE* zu Granulozytenelastase hohe Affinität hat und vollständige Hemmung bereits bei zehnfach geringerer Konzentration als bei Pankreaselastase eintritt.

4. Diskussion

4.1 Im Vordergrund steht die Frage, ob es sich bei BSI-TE* um einen Inhibitor oder etwa um eine artefiziell entstandene Aggregation von BSI-TE und -E handelt, die die beschriebenen inhibitorischen und immunologischen Eigenschaften ja durchaus aufweisen könnte.

Gegen diese Hypothese spricht das relativ zu niedrige Molekulargewicht des Inhibitors von 13.000 Da. Ein BSI-TE - BSI-E Aggregatmolekül hätte entsprechend den Einzelkomponenten ein Molekulargewicht von 22.000 Da haben und sich bei der Gelchromatographie vom freien BSI-TE deutlich in der Laufgeschwindigkeit unterscheiden müssen. Eine weitere Hypothese wurde aufgestellt, nach der BSI-TE* die Grundform der niedermolekularen Bronchialsekretinhibitoren darstellt, von der sich BSI-TE und -E ableiten. BSI-TE* zeigt ein Hemmspektrum, das sich -soweit bisher bekannt- genau mit denjenigen der beiden anderen Inhibitoren deckt. Zudem weist er ein geringfügig höheres Molekulargewicht als BSI-TE und -E auf, so daß man etwa an eine Umformung des Basisinhibitors in seine Unterformen durch limitierte Proteolyse denken könnte. Ein solcher Umformungsmodus gewinnt an Wahrscheinlichkeit angesichts der Vielzahl von Reaktionen im Enzymstoffwechsel, die auf limitierte Proteolyse beruhen. Derart werden z.B. Proenzyme aktiviert (Blutgerinnung) oder der Inter-Alpha-Trypsininhibitor III in seine gewebeängige Form, den HI-30, überführt.

4.2 Geht man weiter von der Theorie des Basisinhibitors BSI-TE* aus, so wäre noch ein anderer Transformationsmodus in die jeweiligen Unterformen denkbar:

Durch partielle Inaktivierung des Basisinhibitors könnten Inhibitoren entstehen, die zwar noch Hemmaktivität besitzen, aber nicht mehr das volle Hemmspektrum ihrer Vorstufe aufweisen. Eine solche partielle Inaktivierung wird beispielsweise beim HI-30 angenommen. Dieser Serum-inhibitor besteht aus zwei homologen Domains (Abb.2).

Die antitryptische Wirkung geht vom reaktiven Zentrum des Domains II aus;es wird wahrscheinlich durch die Aminosäure Arginin repräsentiert. Gegen Granulozytenelastase zeigt HI-30 nur eine sehr schwache Wirkung.Im reaktiven Zentrum des Domains I befindet sich ein Methioninrest.Der homologe Inhibitor zu HI-30 aus Rinder Serum -BI-30- hemmt aber neben Trypsin auch Pankreas- und Granulozytenelastase.Beide Inhibitoren sind im Aufbau weitgehend gleich,im reaktiven Zentrum des Domains I (N-terminal) befindet sich jedoch statt Methionin ein Leucinrest.Diese Aminosäure scheint also für die starke Hemmwirkung des Rinderinhibitors gegen Elastase verantwortlich zu sein.

Bei dem homologen Inhibitor aus Schweineserum steht an der fraglichen Stelle des Domains I zwar Methionin,im Gegensatz zum menschlichen Inhibitor mit Methionin an dieser Stelle zeigt er aber starke Hemmung von Elastase.Der homologe Inhibitor des Pferds wiederum mit praktisch fehlender antielastolytischer Aktivität besitzt einen Leucinrest im reaktiven Zentrum.Die Annahme,daß Leucin allein die starke inhibitorische Aktivität gegen Elastase determiniert,bedarf also offensichtlich der Ergänzung:

Betrachtet man die Aminosäuresequenzen der Inhibitoren in der Nähe der reaktiven Zentren genauer,so fällt auf,daß die starken Elastasehemmer jeweils in Position P2' von Leucinresten besetzt sind,während die schwach antielastolytisch wirkenden Inhibitoren hier Methionin aufweisen (Tabelle 2).Daraus kann gefolgert werden,daß antielastolytische Aktivität eines Inhibitors durch die Aminosäurezusammensetzung sowohl des reaktiven Zentrums (Position P1),als auch der benachbarten Position P2' bestimmt wird.Position P1 scheint hierbei die "Erkennungsstelle" für Elastase zu sein,während die Aminosäure in P2' Einfluß auf die Stärke der Komplexbildung zu haben scheint (2,18,22-24,54-56). Der Einfluß der Aminosäure Methionin auf Vorhandensein oder Fehlen antielastolytischer Aktivität erklärt sich dabei wahrscheinlich wie folgt:

Als schwefelhaltige Aminosäure kann Methionin leicht oxidiert werden; es entsteht dabei ein Sulfoxid.Durch diese Reaktion wird das reaktive Zentrum aber derart vergrößert,daß die Komplexbildung mit dem Elastasemolekül behindert wird (Abb.13).In vitro konnte dieses Phänomen der

selektiven Zerstörung antielastolytischer Aktivität bei Alpha 1 Antitrypsin und bei BSI-TE reproduziert werden. Bei voll erhaltener Hemmwirkung gegen Trypsin verschwand die Elastasehemmung beider Inhibitoren nach Behandlung mit Chloramin T, einem starken Oxidationsmittel.

Diese oxidative Inaktivierung geht in vivo wahrscheinlich von Peroxidasen aus Myelozyten aus, die im Rahmen einer Entzündungsreaktion vermehrt anfallen.

BSI-TE könnte also auf die beschriebene Weise aus BSI-TE* hervorgehen, wenngleich die bei BSI-TE erhaltene Aktivität gegen Granulozytenelastase bei fehlender Hemmung von Pankreaselastase den Schluß nahelegt, daß der Inhibitor antielastolytische Aktivität nicht über ein für beide Elastasearten gemeinsames, sondern über zwei getrennte aktive Zentren entfaltet, oder eine mit dem ITI-Derivat des Schweins (PI-30) vergleichbare Struktur im Bereich des reaktiven Zentrums vorliegt. PI-30 hemmt zwar Elastase, ist aber aufgrund eines Methioninrests in Position P1 oxidativ inaktivierbar.

Die Ableitung von BSI-E aus BSI-TE* kann bisher noch nicht ähnlich schlüssig dargestellt werden; Beispiele für den selektiven Verlust antitryptischer Hemmwirkung bei erhaltener Aktivität gegen Elastase sind für Inhibitoren vom Kazal-Typ (Ovomucoide) bekannt, bei denen Arginin bzw. Lysin in einem Domain durch Glutaminsäure ersetzt sein kann. Abb. 14 zeigt eine vergleichende Aufstellung der Bronchialsekretinhibitoren und ihrer korrespondierenden ITI-Derivate gemäß den obigen Überlegungen. In Analogie zu BSI-E wurde dabei ein hypothetischer Seruminhibitor ohne Trypsinhemmung gesetzt.

4.3 Bei Betrachtung der Ergebnisse der Gelchromatographie (siehe Abb. 4,5) war die Frage aufgetaucht, warum Bronchialsekretinhibitoren - und hier ganz besonders BSI-E - nicht in einheitlicher Form, d.h. entweder völlig komplexiert oder völlig in freier Form, im Sputum zu finden waren. Im Licht von Untersuchungen der Sekrete gesunder Personen (das in der vorliegenden Arbeit verwendete Sammel Sputum stammt von einem Kollektiv unterschiedlich respirationsgestörter Patienten) ergibt sich die Interpretation, daß es sich hier um die Folge der Mehrbeanspruchung des Inhibitorsystems bei Personen mit entzünd-

lichen Atemwegserkrankungen durch erhöhten Anfall von Proteasen handelt: In Sekreten Gesunder lag BSI-TE weitgehend in freier Form vor, so daß es sich hierbei um die physiologische Form handeln dürfte (20,41,43).

4.4 Von HOCHSTRASSER wurde in jüngster Zeit ein Verfahren zur Isolierung der Bronchialsekretinhibitoren entwickelt, das in einigen Punkten von der vorstehend beschriebenen Methode abweicht, Vorteile bietet und daher hier skizziert werden soll:

BSI-TE wird durch Gelchromatographie rohen Sekrets und anschliessende Affinitätschromatographie der Fraktionen mit freier, antitryptischer Aktivität an Trypsinsepharose isoliert.

Zur Gewinnung von BSI-E und -TE* führt HOCHSTRASSER nach Säurefällung der Komplexfraktionen und anschliessender gelchromatographischer Entfernung des HI-30 die Affinitätschromatographie an immobilisiertem Chymotrypsin durch, wobei einerseits BSI-TE* zurückgehalten, andererseits BSI-E nicht wie bei Affinitätschromatographie an Trypsinsepharose irreversibel zerstört wird. Aus dem Durchlauf dieser Affinitätschromatographie läßt sich an immobilisierter Pankreaselastase BSI-E gewinnen.

4.5 Neueste Befunde, die nach Abschluß der Arbeit erhoben wurden, sollen kurz erwähnt werden:

Alle drei Sekretinhibitoren sind keine einheitlichen Proteine. Es gelang zwar, durch Hochdruck-Chromatographie (HPLC) BSI-TE in mehrere Komponenten mit exakt den gleichen Hemmeigenschaften aufzutrennen, Sequenzierungsversuche an den getrennten Komponenten zeigten aber, daß es sich auch hier um keine einheitlichen Proteine handelt. Ein Sequenzbereich, der etwa 70% des Molekulargewichts abdeckt, scheint jedoch in allen Inhibitoren gleich zu sein. Die Befunde können vorerst nur so interpretiert werden, daß für alle Inhibitoren ein konstanter Sequenzbereich angenommen wird, der bei allen Formen identisch ist und ein variabler Sequenzteil die Formenvielfalt bestimmt wie es etwa von den Immunglobulinen her bekannt ist (25).

5. Experimenteller Teil

5.1 Inhibitornachweis im optischen Test

Die routinemäßige Bestimmung der Inhibitoraktivität einer Probe erfolgte photometrisch nach dem Prinzip des gekoppelten optischen Tests. Dabei wird die Konzentration des Inhibitors in einer Lösung anhand der Minderung der Umsatzgeschwindigkeit einer hemmbaren Protease in dieser Lösung gegenüber der Umsatzgeschwindigkeit derselben Protease in einem inhibitorfreien Leerwertansatz ermittelt. Die Protease spaltet in dieser Reaktion vom Substrat den gelben Farbstoff Paranitroanilid ab, dessen Entstehungsgeschwindigkeit der proteolytischen Aktivität direkt proportional ist und im Photometer bei 405 nm direkt verfolgt werden kann (chromogenes Substrat).

Verwendet wurde ein Photometer der Firma Eppendorf mit angeschlossener Rechner-Druckereinheit, die die gemessenen Extinktionsänderungswerte pro Zeiteinheit ausdrückte.

Testansatz antitryptische Aktivität (11):

In einer 3-ml Küvette werden 1,8 ml Tra-Puffer pH 7,8 (- x ml Probe)
 200 µl Trypsinlösung 5 mg%
 x µl Probe
 1 ml Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid
 (BzArgNanp)

gemischt und die Reaktionsgeschwindigkeit durch sofortige Messung im Photometer bestimmt.

Testansatz Aktivität gegen Pankreaselastase (6):

In einer 1-ml Küvette werden 650 µl Tra-Puffer pH 7,8 (- x µl Probe)
 50 µl Pankreaselastaselösung 1 mg%
 x µl Probe
 300 µl Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid
 (SucAlaAlaAlaNanp)

gemischt und die Reaktionsgeschwindigkeit durch sofortige Messung im Photometer bestimmt.

Da die Reaktionsabläufe in beiden Testansätzen temperaturabhängig sind, wurde zur Standardisierung der Ergebnisse die Temperatur bei 28°C konstant gehalten.

Der Testansatz zur Bestimmung der Aktivität gegen Granulozyten-elastase entspricht dem oben beschriebenen für Pankreaselastase bis auf die Verwendung von Succinyl-Ala-Ala-Val-p-nitroanilid (SucAla-AlaValNanp) als Substrat (58).

Die Berechnung der Inhibitoraktivität in Milli-Units (mU)/ml geschieht nach der Formel

$$\frac{\text{delta } E_{\text{Leerwert}} \text{ minus delta } E_{\text{Probe}}}{6,6 \text{ (Trypsin) bzw. } 9,6 \text{ (P.elastase)}}$$

5.2 Gelchromatographie

Glykosidisch kreuzverknüpfte Dextranmoleküle bilden eine Matrix aus feinsten Perlen mit einem Durchmesser von 40-120 µm. Einem Gemisch von Makromolekülen verschiedenen Molekulargewichts setzt diese Matrix bei der Passage unterschiedlichen Durchflußwiderstand entgegen, der sich aus der größenabhängigen Fähigkeit der Makromoleküle erklärt, in präformierten Gelporen "hängenzubleiben". Da dieser Effekt umso stärker wirksam wird, je kleiner das chromatographierte Molekül ist, benötigen kleinere Moleküle der Lösung entsprechend mehr Zeit zur Passage der Chromatographiesäule als größere Moleküle. Es ergibt sich so eine strenge Abhängigkeit zwischen Molekülgröße und Laufgeschwindigkeit.

Je nach verwendetem Geltyp hat man ein werksseitig definiertes Molekulargewichtsspektrum zur Verfügung, innerhalb dessen man Protein- und Kohlehydratgemische auftrennen kann. Beim verwendeten Geltyp G-75 der Firma Pharmacia erstreckte sich dieses Spektrum für Proteine vom Molekulargewicht 3.000 - 80.000 Da und für Kohlehydrate von 1.000 - 50.000 Da (13).

Gelherstellung: Die Geltrockenmasse wurde zum Aufquellen in 0,5 m Boratpuffer eingerührt und 24 Stunden stehengelassen. Das gequollene Gel wurde anschliessend in eine senkrecht stehend befestigte, am unteren Ende durch einen Stopfen mit Glashahn verschlossene Glasröhre von 200 cm Länge und 3 cm Durchmesser gefüllt. Auf ausreichende Länge der Säule ist zu achten, um eine hinreichende Auftrennung der Proteine zu gewährleisten.

Der Durchfluß der Säule wurde über ein Durchflußphotometer (LKB) zu einem Fraktionierautomaten (LKB) geleitet, der das Säuleneulat in Fraktionen variabler Größe sammelte. Das Durchflußphotometer war mit einem 2 - Kanalschreiber verbunden, der die gemessenen Extinktionen graphisch zu den einzelnen Fraktionen in Beziehung setzte.

5.3 Säurefällung

Bringt man eine Proteinlösung auf einen stark sauren pH-Wert, so denaturieren die gelösten Proteine in individueller Abhängigkeit von Protonen- und Salzkonzentration. Es kommt dabei zur Lösung von Ionenbindungen durch Protonenanlagerung an COO^- - Gruppen und zur Lösung von Wasserstoff-Brückenbindungen, durch die im wesentlichen die Quaritärstruktur des Proteins stabilisiert wird (40). Die Folge ist in der Regel ein Ausfallen aus der Lösung und ein Verschwinden enzymatischer Aktivität. Nun verhalten sich Proteine im Hinblick auf Säurebehandlung aber nicht einheitlich. Die hier behandelten Bronchialsekretinhibitoren sind -wie schon erwähnt- säurestabil und erfahren daher keinerlei Veränderung. Aus diesem Grunde stellt die Säurefällung ein ideales Verfahren zur Reinigung des Bronchialsekrets von einem Großteil der enthaltenen Proteine ohne Veränderung seiner untersuchungsrelevanten, inhibitorischen Eigenschaften dar. Säurelabiles Alpha-1 Antitrypsin wird durch die Fällung als störender Faktor ausgeschaltet.

Zur Fällung wurden die zu untersuchenden Lösungen auf eine ca. 3%ige Perchlorsäurekonzentration gebracht und der nach zehnminütiger Einwirkdauer entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und mittels konzentrierter KOH auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Dabei fiel unlösliches Kaliumperchlorat aus, das im Anschluß durch erneute Zentrifugation entfernt wurde.

5.4 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein Verfahren zur Isolierung eines Bestandteils einer Lösung verschiedener Proteine anhand seiner charakteristischen Eigenschaften, d.h. bei Enzymen ihrer Affinität zum Substrat. Grundlage ist ein Agarosegel, das durch Cyanbromid "aktiviert" wird: Hydroxylgruppen der Agarose werden unter Cyanbromideinwirkung

zu Imidocarbonatgruppen umgelagert, die mit nucleophilen Gruppen wie z.B. der primären Aminogruppe eines Proteins reagieren können. An diese Imidocarbonatgruppe koppelt man kovalent einen Liganden, zu dem der zu isolierende Stoff Affinität aufweist. Diese Koppelung erfolgt an mehreren Stellen des Moleküls und macht diese Anordnung sehr stabil. Es muß gewährleistet sein, daß der Ligand beim Kopplungsvorgang nicht so alteriert wird, daß er seine spezifischen Eigenschaften, die zur Komplexbildung mit dem zu isolierenden Stoff führen, einbüßt (Konformationsänderung, Maskierung des aktiven Zentrums).

Herstellung des Trägersgels:

- CnBr-aktivierte Sepharose in 1 mM HCl über 15 Minuten quellen lassen
- Waschen der Sepharose mit mehreren Litern 1 mM HCl
- Spülen der Sepharose mit Puffer 0,5 m NaCl - 0,1 m NaHCO_3 pH 8,3
- Lösen von 5-10 mg Trypsin/ml Sepharose in Puffer 0,5 m NaCl - 0,1 m NaHCO_3 pH 8,3
- Trypsinlösung und Sepharose vereinigen und 2 Stunden bei konstanter Temperatur auf Magnetrührer geben
- Hydrolyse nicht abgesättigter Imidocarbonatgruppen der Sepharose in Tris-HCl Puffer pH 8
- Entfernung überschüssigen Trypsins durch mehrmaliges Spülen der Sepharose im Wechsel mit saurem (0,5 m NaCl - 0,1 m Acetat pH 4) und basischem (z.B. Kopplungspuffer wie oben) Puffer.

Die Koppelung anderer Liganden erfolgt analog dem vorstehend für Trypsin beschriebenen Verfahren.

Das gebrauchsfertige Gel wurde in eine Glassäule von 30 cm Länge und 5 cm Durchmesser gefüllt und senkrecht stehend befestigt. Eine ausreichende Länge der Trennstrecke wie bei der Gelchromatographie ist hier nicht erforderlich. Das Säuleneluat wurde wiederum über ein Durchflußphotometer (LKB) in einem Fraktionierautomaten (LKB) gesammelt (siehe Versuchsanordnung Gelchromatographie).

Bei der Passage der inhibitorhaltigen Lösungen mußte ein leicht basischer pH strikt eingehalten werden, um eine möglichst vollständige

Ausbildung der Enzym-Inhibitor Komplexe zu gewährleisten. Nach restloser Auswaschung nicht gebundener Proteine aus der Säule (mindestens zehnmütiger Abfall der Extinktionskurve der Photometer-Schreibereinheit auf die Nulllinie) wurde der Inhibitor durch Änderung des pH mittels einer 0,3 m KCl Spüllösung pH 1 aus dem Komplex gelöst und eluiert (1).

5.5 Immundiffusionstechnik nach Ouchterlony

Haupteinsatzgebiet dieser Technik ist der einfach qualitative Antigennachweis und die grob quantitative Antigentiterbestimmung. Eine Differenzierung der jeweils präzipitierenden Komponenten einer Lösung verschiedener Stoffe ist mit dieser Technik nicht möglich. Agarose wird im Wasserbad zum Schmelzen gebracht. 1 ml der verflüssigten Agarose wird im Reagenzglas mit 1 ml eines erhitzten Barbitursäurepuffers vermischt und unverzüglich auf eine 5 x 5 cm messende Glasplatte aufgegossen, so daß diese von einer homogenen, ca. 2 mm starken Schicht bedeckt ist. Nach dem Erstarren wird über einer Schablone ein Loch mit einem Fassungsvermögen von 10 µl in die Mitte der Agaroseschicht gestanzt. In Form eines konzentrischen Kreises bringt man um dieses Zentralloch weitere Löcher gleicher Größe an, die mit den zu untersuchenden Antigenlösungen gefüllt werden. Das Zentralloch wird mit Antikörperlösung gefüllt. Die Glasplatten werden für 24 Stunden in die feuchte Kammer gestellt. Danach werden eventuelle Präzipitate mittels Coomassieblue angefärbt. (5).

5.6 Immunelektrophorese

Auf einen herkömmlichen Objektträger wird nach obigem Muster eine Agaroseschicht aufgebracht und ein Loch von 10 µl Fassungsvermögen eingestanzt, das mit der zu untersuchenden Antigenlösung befüllt wird. An das Gel wird eine elektrische Spannung angelegt, die die geladenen Komponenten der Lösung gemäß ihrer Ladung und Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zu Anode bzw. Kathode wandern läßt. Nach hinreichend langer Auftrennzeit entfernt man die Spannungsquelle und stanzt parallel zur Laufrichtung der Lösungsbestandteile eine Rinne in die Gelschicht, die mit Antikörperlösung gefüllt wird. Durch die

Diffusion des Antikörpers in Richtung der aufgetrennten Proteine entsteht ein charakteristisches Präzipitatomuster, das anhand von Vergleichsläufen mit bekannten Substanzen die Identifizierung einzelner Komponenten der Lösung erlaubt. Zur besseren Erkennbarkeit der Präzipitate wird anschliessend eine Proteinfärbung mit Coomassieblue durchgeführt (48).

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

- Bei gelchromatographischer Auftrennung von Sputum wird niedermolekularer Inhibitor mit Hemmwirkung gegen Trypsin und Granulozytenelastase gefunden; Bezeichnung BSI-TE.
- Durch Fällung von Komplexproteasen werden weitere, vorher maskierte Inhibitoren mit Hemmwirkung gegen Trypsin und Granulozytenelastase bzw. Pankreaselastase und Granulozytenelastase freigesetzt; Bezeichnung BSI-TE, BSI-E.
- Bei Affinitätschromatographie an immobilisierter Pankreaselastase wird BSI-E zerstört. Es gelingt dagegen die Isolierung von BSI-TE und eines neuen Inhibitors mit Hemmwirkung gegen Trypsin und Pankreaselastase an immobilisiertem Trypsin; Bezeichnung BSI-TE*.
- Beim Versuch der immunologischen Charakterisierung zeigt sich die bestehende Überlagerung von BSI-TE* mit BSI-TE.
- Es wird versucht, den neuen Inhibitor mit Pankreaselastase zu komplexieren und so gelchromatographisch von BSI-TE zu separieren. Der in vitro gebildete Komplex erweist sich als instabil, doch eluiert BSI-TE* infolge seines geringfügig höheren Molekulargewichts etwas vor BSI-TE und kann durch wiederholte Gelpassage rein dargestellt werden.
- Das Molekulargewicht von BSI-TE* wird zu 13.000 Da bestimmt.
- Eine Hemmkinetik von BSI-TE* gegen Granulozytenelastase wird bestimmt und ergibt starke Hemmung.

Bezeichnung	Molekulargew.	Säurestab.	Hemmwirkung gegen					
			Trypsin	Elastase(Pank.)	Elastase(Gran.)	Kollagenase	Chymotrypsin	
Alpha 1 - AT	58.000	-	+	+		+		+
BSI-TE	11.000	+	+	-		+	-	+
BSI-E	11.000	+	-	+		+	-	-
BSI-TE*	13.000	+	+	+		+	?	+
HI - 30	30.000	+	+	-		(+)	-	+

TAB. 1 ÜBERSICHT DER IM BRONCHIALSEKRET VORKOMMENDEN PROTEASEINHIBITOREN

	DOMAIN I						ELASTASEHEMMUNG
	P_4	P_3	P_2	P_1	P_1, P_2'		
MENSCH	...	G...	P...	C...	M...	G...	FEHLT
RIND	...	G...	P...	C...	L...	G...	GUT
PFERD	...	G...	P...	C...	L...	G...	FEHLT
SCHWEIN	...	G...	P...	C...	M...	G...	GUT

TAB. 2 ZUSAMMENSETZUNG DER AKTIVEN ZENTREN DER I-30 HOMOLOGEN INHIBITOREN

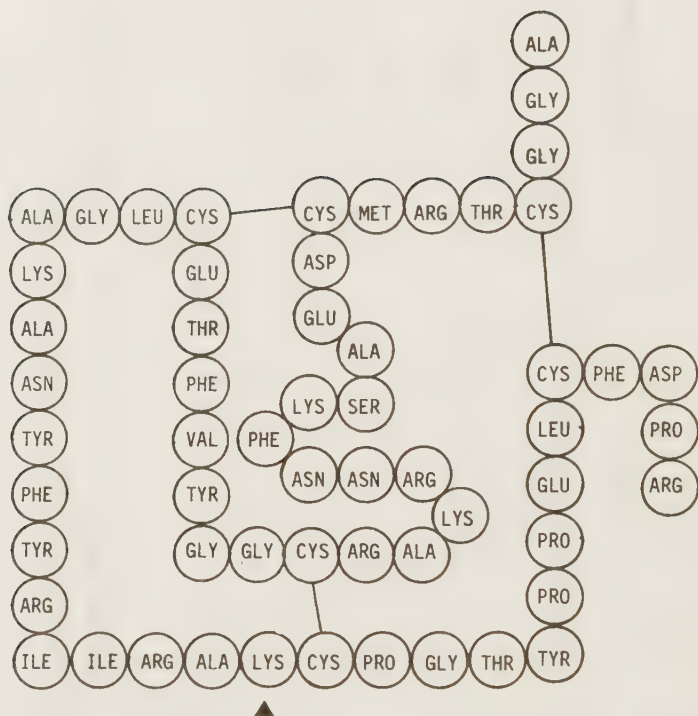


ABB. 1 SCHEMA DES TRYPSININHIBITORS AUS RINDERGEWEBE BPTI

► AKTIVES ZENTRUM

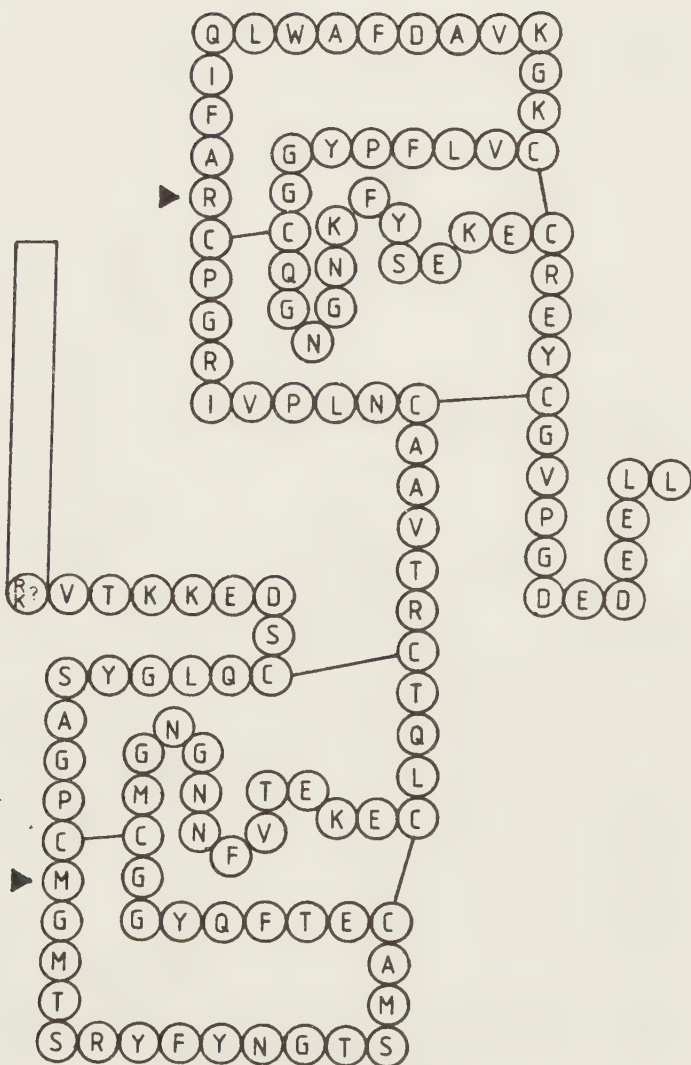


ABB. 2 SCHEMA DES DOPPELKÖPFIGEN PROTEASEINHIBITORS HI-30

► AKTIVE ZENTREN, R = ARGININ, M = METHIONIN

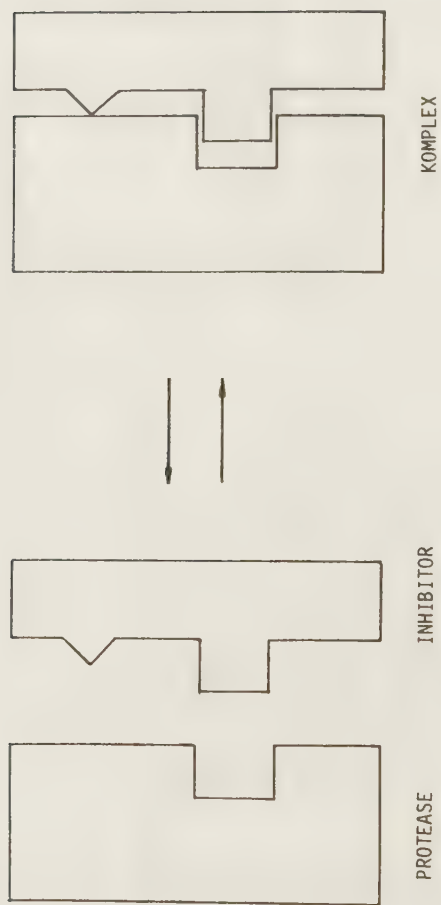


ABB. 3 STERISCHE BLOCKIERUNG EINES AKTIVEN ZENTRUMS

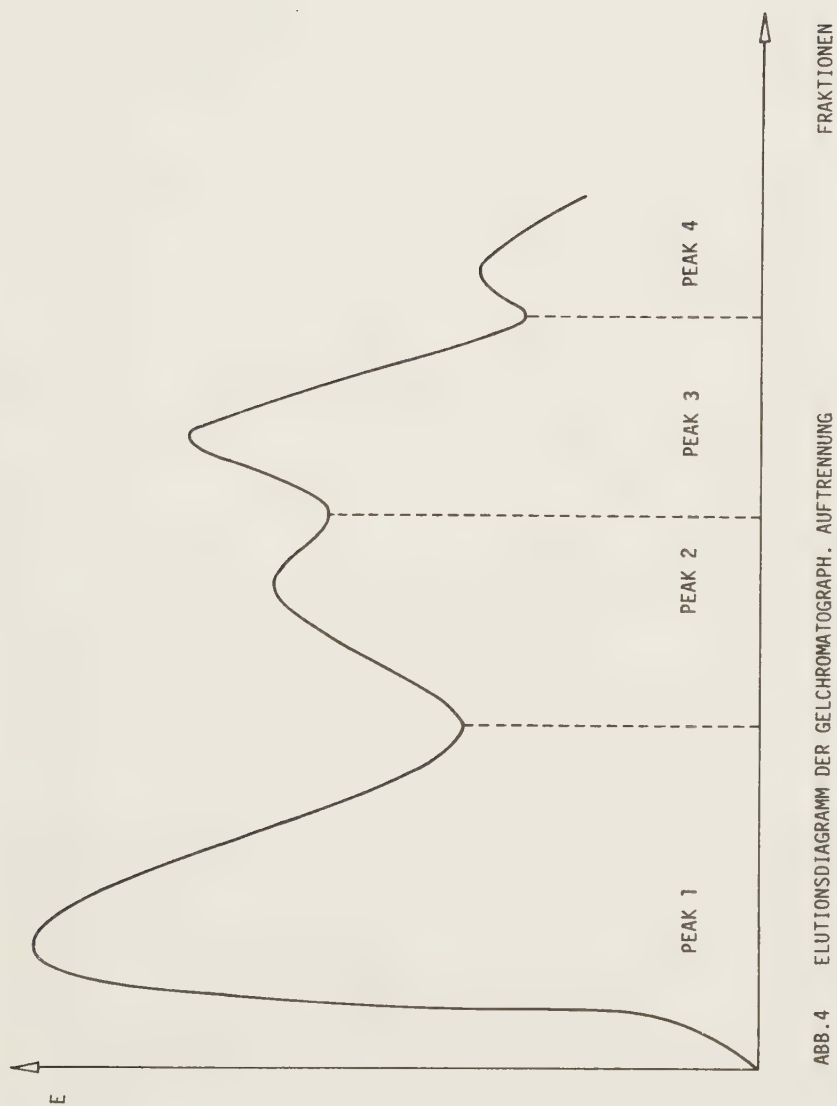


ABB. 4 ELUTIONSDIAGRAMM DER GELCHROMATOGRAPH. AUFTRENNUNG
DES ROHSPUTUMS

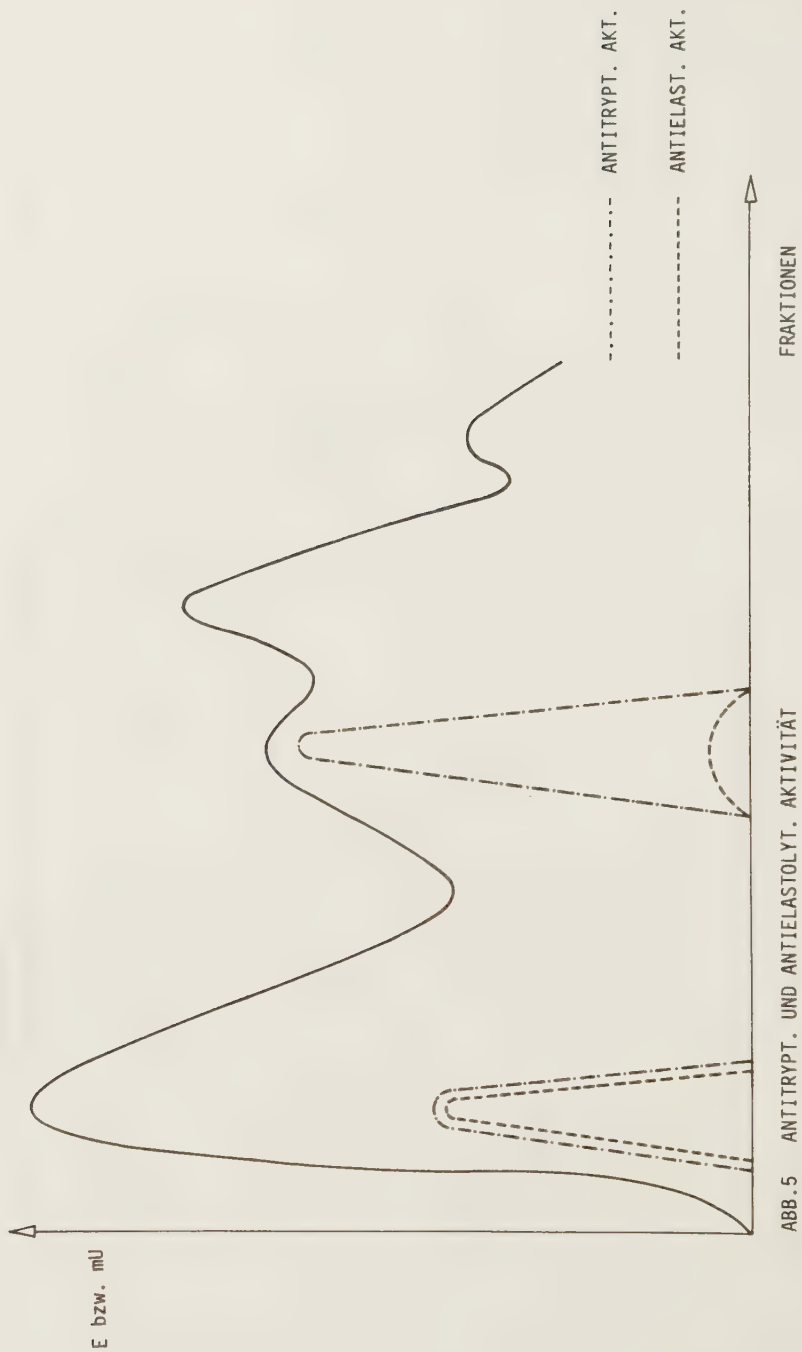


ABB. 5 ANTITRYPT. UND ANTIELASTOLYT. AKTIVITÄT
NACH SÄUREFÄLLUNG

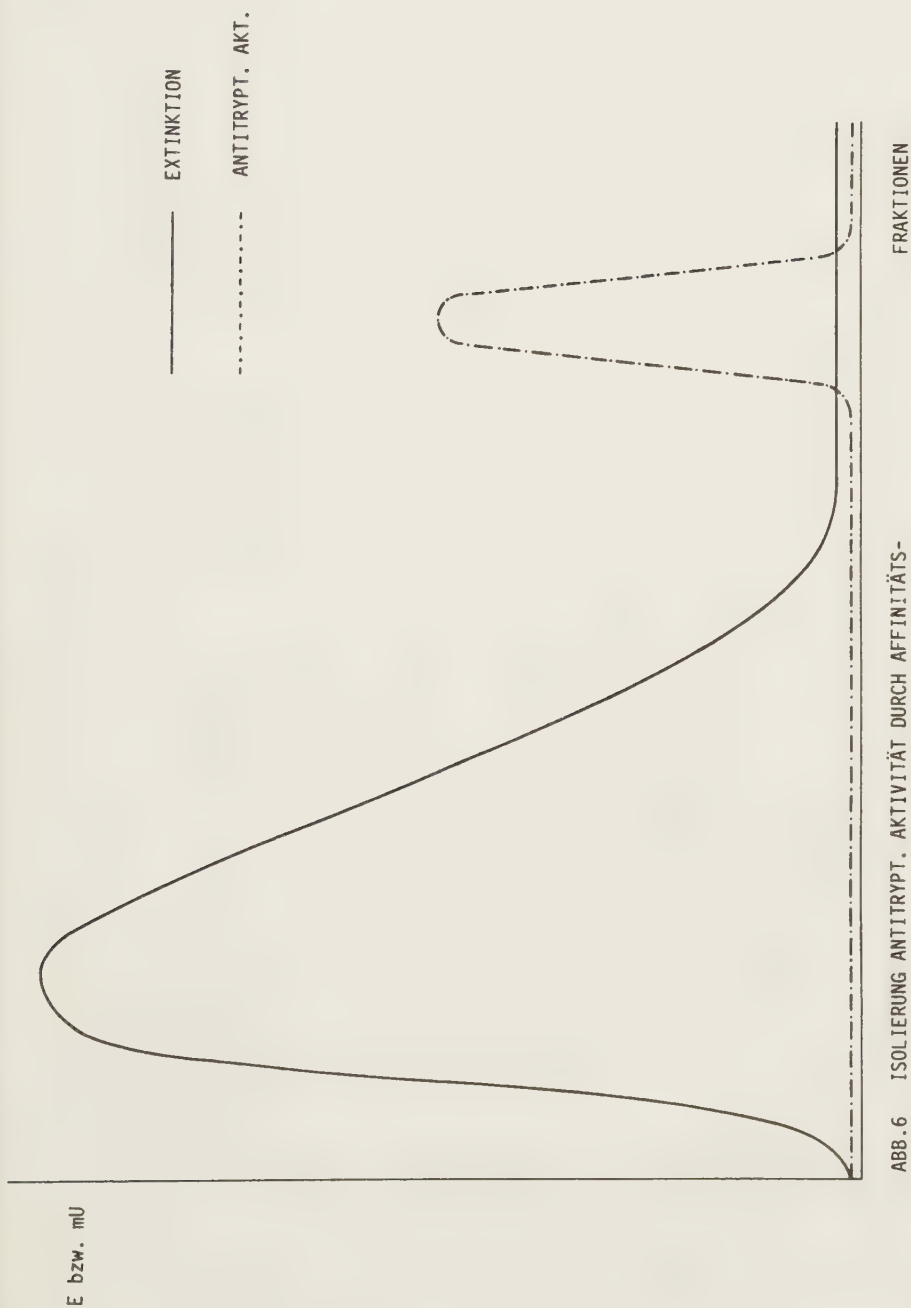


ABB. 6 ISOLIERUNG ANTITRYPT. AKTIVITÄT DURCH AFFINITÄTS-
CHROMATOGRAPHIE AN IMMOB. TRYPSIN

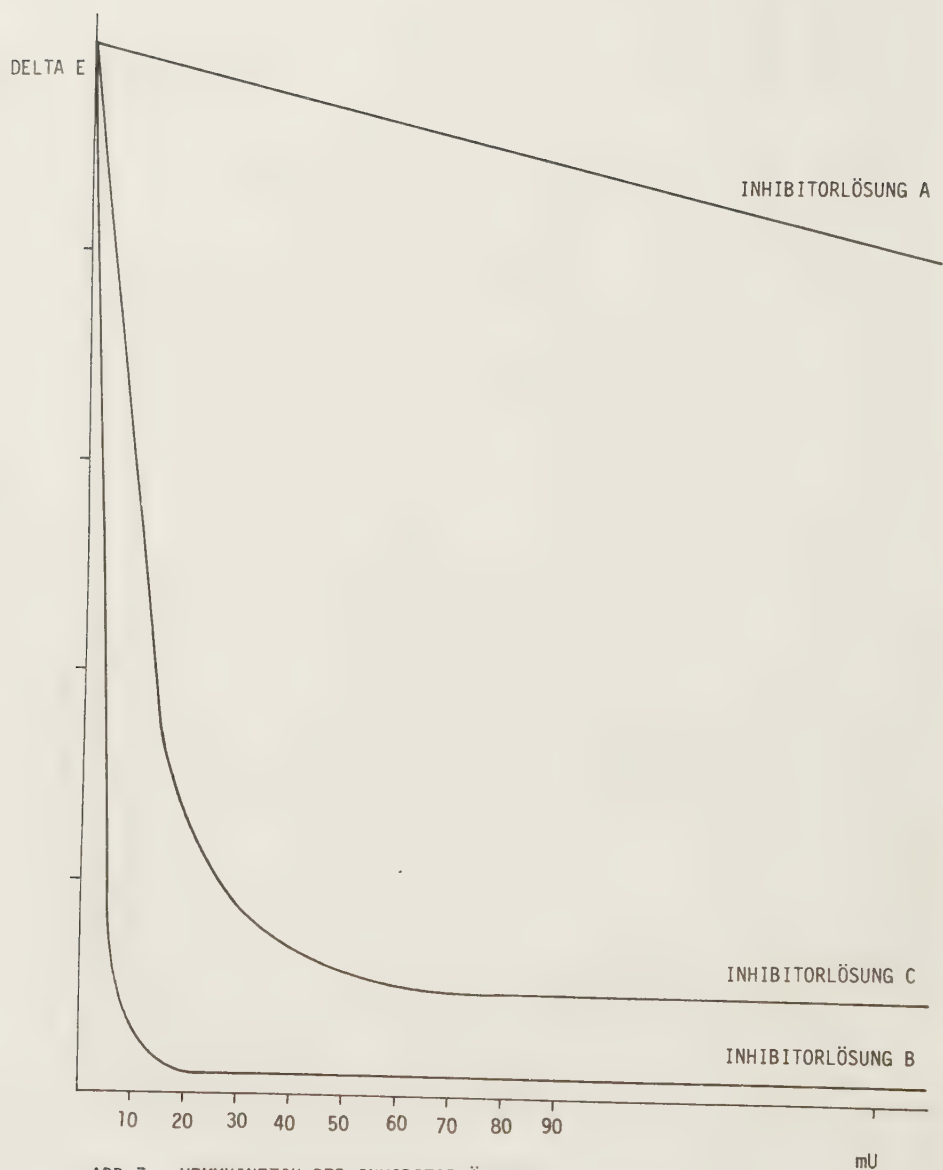


ABB.7 HEMMKINETIK DER INHIBITORLÖSUNGEN A - C
GEGEN PANKREASELASTASE

1 - 6: AUFSTEIGENDE KON-
ZENTRATIONEN DER
LÖSUNGEN

A: 3,8 - 38 mU

B: 4,2 - 28 mU

C: 4,8 - 24 mU

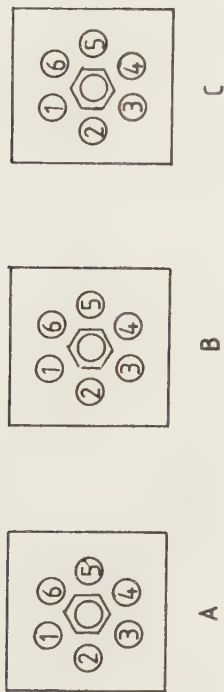


ABB. 8 IMMUNDIFFUSION NACH OUCHTERLONY



ABB. 9 IMMUNELEKTROPHORESE

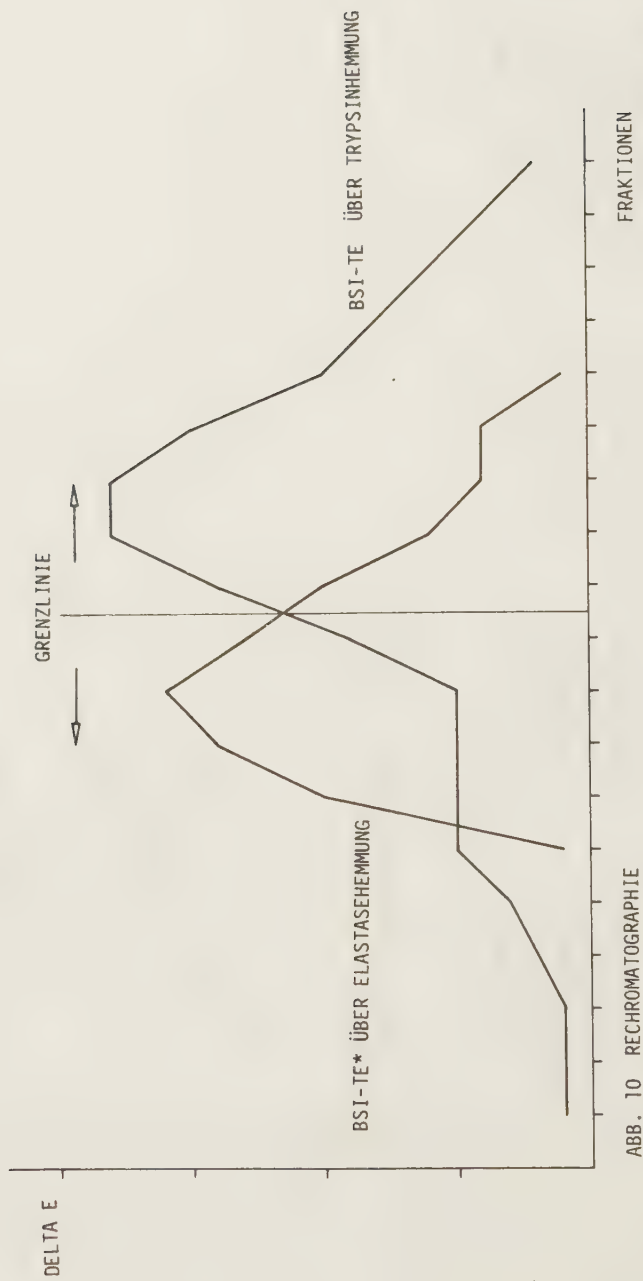


ABB. 10 RECHROMATOGRAPHIE



ABB. 11 EICKURVE DER GELCHROMATOGRAPHIESÄULE

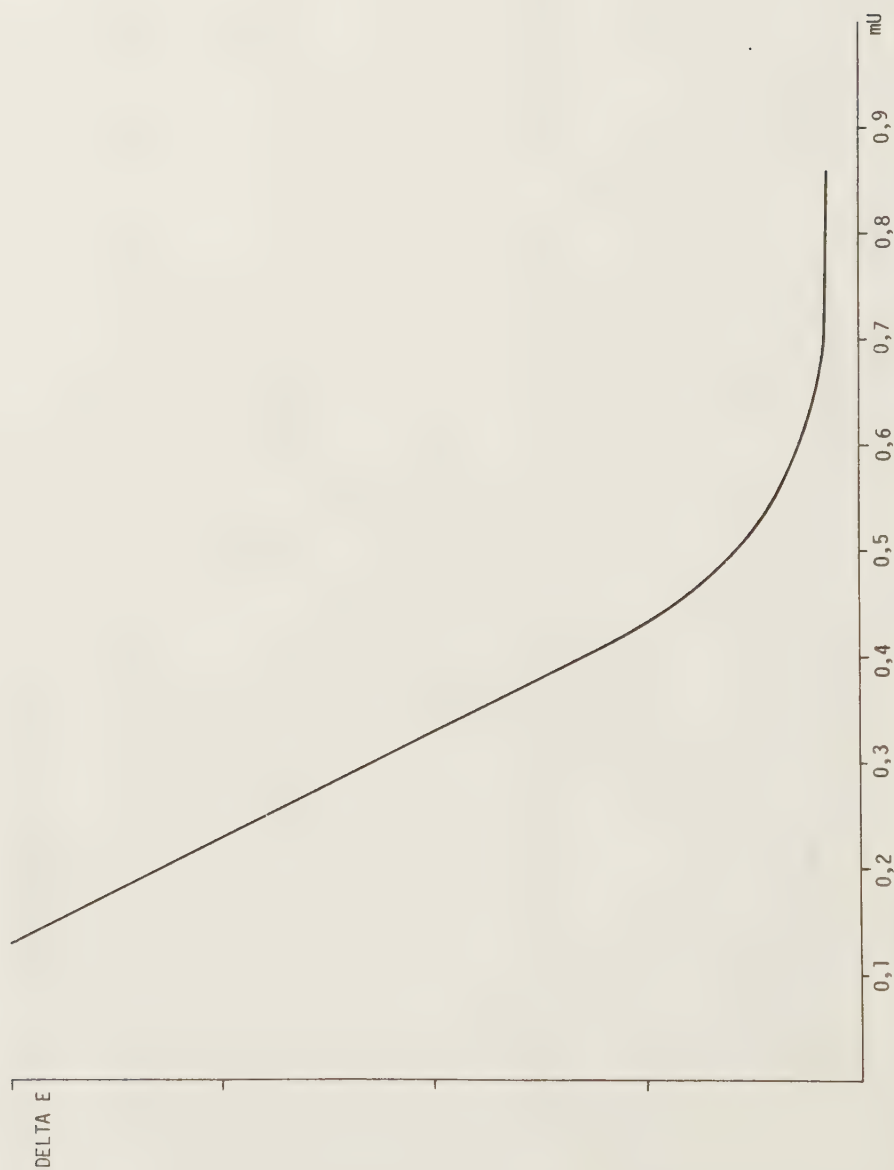


ABB. 12 HEMKINETIK BSI-TE* GEGEN LEUCOZYTENELASTASE

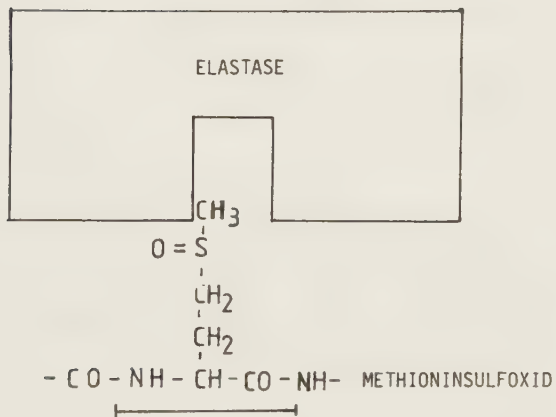
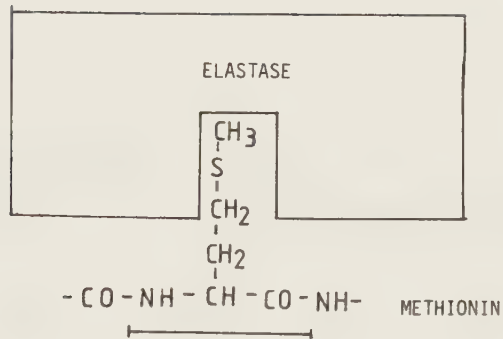


ABB. 13 OXIDATIVE INAKTIVIERUNG

**Erklärung der Hemmeigenschaften der sekretorischen Inhibitoren durch
Vergleich mit Inhibitoren bekannter kovalenter Struktur**

Inter-alpha-trypsininhibitoren

Spezies	Hemmung von	inaktivierbar	reaktive Zentren	Hemmung von
			$P_1 \quad P_2' \quad P_1$	
Mensch	E_L	ja	-CMGM-----CRAF-	T
Pferd	E_L	ja	-CLGM-----CRAF-	T
Schwein	$E_L E_p$	ja	-CMGL-----CRAF-	T
Rind	$E_L E_p$	nein	-CLGL-----CRAF-	T
hypthet. Inhibitor	$E_L E_p$	ja	-CMGL-----CEAF-	T

Sekretorische Inhibitoren

reaktive Zentren spezifisch für:	
Elastasen	Trypsin
E_L	T
SI-TE	
$E_L E_p$	T
SI-TE*	
kein entsprechender Sekretinhibitor vorhanden	
$E_L E_p$	T
SI-E	

HOCHSTASSER, WACHTER & ALBRECHT 1983

ABB. 14 VERGLEICHENDE AUFSTELLUNG DER BSI-INHIBITOREN UND DER
KORRESPONDIERENDEN ITI-DERIVATE

Literaturverzeichnis:

- 1 Affinity Chromatography, Principles and Methods, Pharmacia, Freiburg
- 2 Albrecht, G.J., Hochstrasser, K., Schönberger, Ö.L.; Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor IX, Isolation and Characterisation of the Inhibitory Active Part of Inter-Alpha-Trypsin Inhibitors from Several Mammalian Sera. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. (1983) i.p.
- 3 Barrett, A.J., Starkey, P.M.; The Unique Nature of the Interaction of Alpha-2-Macroglobulin with Proteinases; in: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E. (Eds.); Proteinase Inhibitors, Springer, 1974, p.76
- 4 Barrett, A.J., Starkey, P.M.; The Unique Nature of the Interaction of Alpha-2-Macroglobulin with Proteinases; in: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E. (Eds.); Proteinase Inhibitors, Springer, 1974, p.73
- 5 Bier, O.G., Götze, D., Mota, I., Dias da Silva, W.; Experimentelle und klinische Immunologie, Springer, 1979, S.115
- 6 Bieth, J., Spiess, B., Wermuth, C.G.; The Synthesis and Analytical Use of a Highly Sensitive and Convenient Substrate of Elastase. Biochem.Med. 11, 350-357 (1974)
- 7 Donaldson, V.H., Evans, R.R.; J.Allergy 33, 316-329
- 8 Feinstein, G.; Proteinase Inhibitors in Human Synovial Fluids of Patients with Joint Diseases; in: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E. (Eds.); Proteinase Inhibitors, Springer, 1974, p.109
- 9 Fink, W., Jaumann, E., Fritz, H., Ingrisch, H., Werle, E.; Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 352, 1591-1594 (1971)
- 10 Fritz, H., Schiessler, H., Geiger, R., Ohlsson, K., Hochstrasser, K.; Naturally Occurring Low Molecular Weight Inhibitors of Proteinases from PMN-Granulocytes and of Kallikrein; Agents and Action 8, 57-64
- 11 Fritz, H., Trauschold, E., Werle, E.; in: Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, 1970, 1021-1031

- 12 Ganrot, P.O., Schersten, B.; *Clin. Chim. Acta* 15, 113-120
- 13 Gel Filtration, Theory and Practice, Pharmacia, Freiburg
- 14 Heimbürger, N.; *Biochemistry of Proteinase Inhibitors from Human Plasma: A Review of Recent Development*; in: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E. (Eds.); *Proteinase Inhibitors*, Springer, 1974, p. 14
- 15 Heimbürger, N., Haupt, H., Schwick, H.G.; in: Fritz, H., Tschesche, H. (Eds.); *Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors*, p. 1-21
- 16 Hochstrasser, K.; *The Acid-Stable Proteinase Inhibitors of the Respiratory Tract. Chemistry and Function.*; *Bull. Eur. Physio.-path. resp.* 16, suppl. 223-228 (1980)
- 17 Hochstrasser, K., Albrecht, G.J., Schönberger, Ö.L., Rasche, B., Lempert, K.; *An Elastase-Specific Inhibitor from Human Bronchial Mucus. Isolation and Characterisation.*; *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 362, 1369-1375 (1981)
- 18 Hochstrasser, K., Albrecht, G.J., Schönberger, Ö.L., Wachter, E.; *Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor VIII, Characterisation of the Bovine Inhibitor as Double-Headed Trypsin-Elastase Inhibitor.*; *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* (1983) i.p.
- 19 Hochstrasser, K., Feuth, H., Hochgesand, K.; *Proteinase Inhibitors of the Respiratory Tract: Studies on the Structural Relationship between Acid-Stable Inhibitors Present in the Respiratory Tract, Plasma and Urine*; in: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E. (Eds.); *Proteinase Inhibitors*, Springer, 1974, p. 112
- 20 Hochstrasser, K., Naumann, R., Albrecht, G.J.; *Neue Methoden zur differenzierten Erfassung des antiproteolytischen Systems des menschlichen Bronchialsekrets*; *Atemwegs- und Lungenkrankheiten* 9, 136-139, (1983)
- 21 Hochstrasser, K., Reichert, R., Schwarz, S., Werle, E.; *Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseninhibitors aus menschlichem Bronchialsekret*; *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 353, 221
- 22 Hochstrasser, K., Schönberger, Ö.L., Rossmann, I., Wachter, E.; *Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor V, Attachments of Carbo-*

- hydrates in the Human Urinary Trypsin Inhibitor Isolated by Affinity Chromatography;Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.362,1357-1362
- 23 Hochstrasser,K.,Wachter,E.;Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor I,Determination of the Amino Acid Sequence of the Antitryptic Domain by Solid-Phase Edman Degradation;Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.360,1285-1296 (1979)
 - 24 Hochstrasser,K.,Wachter,E.;Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor VII,Determination of the Amino Acid Sequence of the Trypsin Released Inhibitors from Bovine Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. (1983) i.p.
 - 25 Hochstrasser,K.,Wachter,E.; nicht publiziert
 - 26 Hochstrasser,K.,Wachter,E.,Bretzel,G.;Identification of the Acid-Stable Trypsin-Plasmin Inhibitors of the Human and Bovine Serum as Kunitz-Type Inhibitors;Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 357,1659 (1976)
 - 27 Janoff,A.,Carp,H.,Lee,D.K.;Inactivation of Alpha-1 Proteinase Inhibitor and Bronchial Mucous Proteinase Inhibitors by Cigarette Smoke in Vitro and in Vivo;Bull.Eur.Physio.-path.resp.16,suppl. 321-338 (1980)
 - 28 Karlson,P.;Kurzes Lehrbuch der Biochemie,Thieme,1974,S.135
 - 29 Karlson,P.;Kurzes Lehrbuch der Biochemie,Thieme,1974,S.138
 - 30 Karlson,P.;Kurzes Lehrbuch der Biochemie,Thieme,1974,S.59 f
 - 31 Kress,L.F.,Laskowski,Sr.,M.;Purification,Properties and Composition of Alpha-1 Antitrypsin Inhibitor from Human Plasma;in: Fritz,H.,Tschesche,H.,Greene,L.J.,Truscheit,E. (Eds.);Proteinase Inhibitors,Springer,1974,p.23
 - 32 Küppers,F.;Human Alpha-1 Antitrypsin Phenotypes;in:Fritz,H., Tschesche,H.,Greene,L.J.,Truscheit,E. (Eds.);Proteinase Inhibitors,Springer,1974,41
 - 33 Kunitz,M.,Northrop,J.H.;J.gen.Physiol.19,991-1007
 - 34 Laskowski,Sr.,M.,Wu,F.C.;J.biol.Chem.204,797 (1953)
 - 35 Laurell,C.-B.,Eriksson,S.;Scand.J.clin.Lab. Invest.15,132-140, (1963)

- 36 Rapoport,S.M.;Medizinische Biochemie,VEB Verlag Volk und Gesundheit,1966,S.613
- 37 Rapoport,S.M.;Medizinische Biochemie,VEB Verlag Volk und Gesundheit,1966,S.648
- 38 Rapoport,S.M.;Medizinische Biochemie,VEB Verlag Volk und Gesundheit,1966,S.415
- 39 Rapoport,S.M.;Medizinische Biochemie,VEB Verlag Volk und Gesundheit,1966,S.813
- 40 Rapoport,S.M.;Medizinische Biochemie,VEB Verlag Volk und Gesundheit,1966,S.75
- 41 Rasche,B.,Hochstrasser,K.;Elastase und Elastaseinhibitoren im Bronchialschleim bei chronischen Atemwegsobstruktionen unter Berücksichtigung der Therapie;Prax.Klin.Pneumonol.37,399-1104, (1983)
- 42 Rasche,B.,Hochstrasser,K.,Albrecht,G.J.,Ulmer,W.T.;An Elastase Specific Inhibitor from Human Bronchial Mucus.Pathogenesis in Lung Emphysema;Respiration 44,397-402 (1983)
- 43 Rasche,B.,Hochstrasser,K.,Ulmer,W.T.;Elastase und Elastaseinhibitoren im Bronchialsekret und deren Bedeutung bei der Emphysementwicklung,Atemwegs-und Lungenkrankheiten 8,288-291 (1982)
- 44 Roberts,R.C.,Riesen,W.A.,Hall,P.K.;Studies on the Quarternary Structure of Human Serum Alpha-2 Macroglobulin;in:Fritz,H.,Tschesche,H.,Greene,L.J.,Truscheit,E. (Eds.);Proteinase Inhibitors,Springer,1974,p.70
- 45 Roberts,R.C.,Riesen,W.A.,Hall,P.K.;Studies on the Quarternary Structure of Human Serum Alpha-2 Macroglobulin;in:Fritz,H.,Tschesche,H.,Greene,L.J.,Truscheit,E. (Eds.);Proteinase Inhibitors,Springer,1974,p.63
- 46 Schettler,G.;Innere Medizin II,Thieme,1980,S.270
- 47 Schiessler,H.,Hochstrasser,K.,Ohlsson,K.;Acid-Stable Inhibitors of Granulocyte Neutral Proteinase in Mucous Secretions:Biochemistry and Possible Biological Function;in:Havemann,K.,Janoff,A. (Eds.);Neutral Proteinases of Human PMN-Leucocytes,Urbán und Schwarzenberg,1978
- 48 Schneider,W.,Berndt,H.;Praktikum und Atlas der Immunelektrophorese;J.F. Lehmanns,1976,S.30

- 49 Schuster,R.;Nachweis und quantitative Bestimmung von Komplexen zwischen Leukozytenproteasen und Alpha-1 Antitrypsin in Körperflüssigkeit und Körpersekret;Dissertation,Ludwig-Maximilians-Universität München,1974
- 50 Steinbuch,M.,Audran,R.;Biology and Pathology of Plasma Proteinase Inhibitors,in:Fritz,H.,Tschesche,H.,Greene,L.J.,Truscheit,E. (Eds.),Proteinase Inhibitors,Springer,1974,p.89
- 51 Tisowsky,M.-C.;Freilegung eines säurestabilen Inhibitors durch Thermolysin nach erschöpfender Trypsinbehandlung von Serum und Identifizierung seiner Vorstufen;Dissertation,Ludwig-Maximilians-Universität München,1980
- 52 Travis,J.,Johnson,D.,Pannell,R.;Properties of Human Alpha-1 Antitrypsin,in:Fritz,H.,Tschesche,H.,Greene,L.J.,Truscheit,E. (Eds.),Proteinase Inhibitors,Springer,1974,p.31
- 53 Van der Meer,J.,Stoepman-Van Dalen,E.A.,Jansen,J.M.S.;IVth Int. Congr. on Thrombosis and Haemostasis,Vienna,1973,abstract p.226
- 54 Wachter,E.,Hochstrasser,K.;Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor III,Sequence of the two Kunitz-Type Domains Inside of the Native Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor and also of its Cleavage Products;Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.360,1305-1311 (1979)
- 55 Wachter,E.,Hochstrasser,K.;Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor IV,The Amino Acid Sequence of the Human Urinary Trypsin Inhibitor Isolated by Affinity Chromatography;Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.362,1355-1357 (1981)
- 56 Wachter,E.,Hochstrasser,K.,Bretzel,G.,Heindl,S.;Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor II,Characterisation of a Second Inhibitory Inactive Domain by Amino Acid Sequence Determination, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.360,1297-1303 (1979)
- 57 Weinland,E.;Z.Biol.44,1 (1903)
- 58 Wenzel,H.R.,Engelbrecht,S.,Reich,H.,Mondry,W.,Tschesche,H.;Synthesis and Analytical Use of 3-Carboxypropionyl-alanyl-alanyl-valine-4-nitroanilide:A Specific Substrate for Human Leucocytic Elastase.Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.361,1413-1416 (1980)

- 59 Zuck, T.F., Bergin, J.J., Perkins, R.P., Barber, J.A., Shigeta, F.H.;
IVth Int. Congr. on Thrombosis and Haemostasis, Vienna, 1973, ab-
stract p.223

Mein herzlichster Dank geht an Herrn Prof.Dr.K.Hochstrasser für die Überlassung des Themas und seine bereitwillige Unterstützung.

Ferner möchte ich Herrn Dr.Ö.L.Schönberger und Frau K.Lempart für ihre ständige Hilfestellung bei allen kleinen und großen Problemen danken.

Lebenslauf

9. August 1956	Geboren in Würzburg als Sohn von Dr. med. Hans-Heinz Naumann und Margrit Naumann, geb. Rosenwirth
1960	Übersiedelung nach Berlin
1962 - 1967	Besuch der Erich-Kästner-Grundschule
1967 - 1970	Besuch des Evang. Gymnasiums "Zum grauen Kloster"
1970	Übersiedelung nach München
1970 - 1971	Besuch des Kurt-Huber-Gymnasiums
1971 - 1976	Besuch des Gymnasiums Derksen; Abitur
1976 - 1977	Wehrdienst
1977 - 1983	Medizinstudium in Regensburg, Würzburg und München
20.10.1983	Bestehen der Ärztlichen Prüfung

